

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-301893

(43)公開日 平成5年(1993)11月16日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 07 K 13/00		8619-4H		
C 12 N 1/21		7236-4B		
5/10				
	8931-4B	C 12 N 15/ 00	A	
	7236-4B	5/ 00	B	

審査請求 未請求 請求項の数11(全36頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平4-3399	(71)出願人	000002934 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(22)出願日	平成4年(1992)1月10日	(72)発明者	成尾 憲一 兵庫県三田市南が丘1丁目1番2号
(31)優先権主張番号	特願平3-20860	(72)発明者	瀬古 智佐子 大阪府高槻市塚原1丁目7番9-306号
(32)優先日	平3(1991)2月14日	(72)発明者	黒川 勉 兵庫県川西市水明台1丁目1番地の50
(33)優先権主張国	日本 (JP)	(72)発明者	近藤 達也 東京都文京区本駒込5丁目4番6-1201号
(31)優先権主張番号	特願平3-224454	(74)代理人	弁理士 大多和 明敏 (外1名)
(32)優先日	平3(1991)9月4日		
(33)優先権主張国	日本 (JP)		

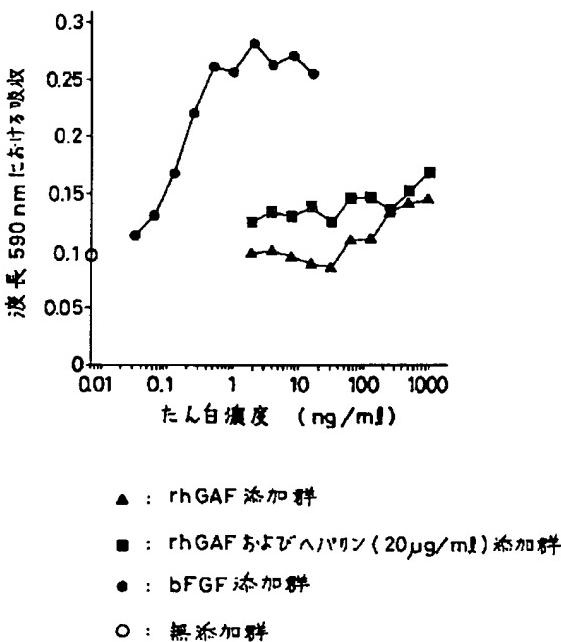
(54)【発明の名称】 グリア活性化因子およびその製造法

(57)【要約】

【目的】グリア細胞に特異的に増殖促進および栄養活性作用を有する新規な因子を見出すと共に、このものを効率よく製造する方法を提供する。

【構成】ヒト由来グリオーマ細胞株を培養した細胞培養上清から、ラット脳細胞からのグリア細胞増殖活性を指標としてグリア活性化成長因子を単離、精製し、それをコードするcDNAの塩基配列、それから推定されるアミノ酸配列を解明すると共に、遺伝子工学的にGAFを発現した。

【効果】本発明で得られたグリア活性化因子は新規な蛋白質で、グリア細胞、線維芽細胞に対し増殖活性を有し、脳疾患改善薬等の医薬として用いることが期待できる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】グリオーマ細胞培養液より得られ、かつグリア細胞増殖促進活性を有する蛋白質であるグリア活性化因子。

【請求項2】グリオーマ細胞がヒトグリオーマ細胞である請求項1記載のグリア活性化因子。

【請求項3】アミノ酸配列：

Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg
Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly
Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu
Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser
Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu
Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg
Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val
Asp Pro Asp

で示されるポリペプチドを含むグリア活性化因子または該因子作用を有するそのムテイン。

【請求項4】アミノ酸配列：

(Met)n-X₁-Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg
Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly
Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu
Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser
Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu
Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg
Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val
Asp Pro Asp -X₂

[ただしnは0または1を、X₁はAla Pro Leu Gly Glu Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala Val Pro Ph e Gly Asn Val Pro Val Leu Pro Val Asp Ser Pro Val Leu Ser Asp His Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly Gly

Leu Pro Arg Gly Pro Ala Val Thr Asp またはその断片

を、X₂はLys Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Ile Leu S er Gln Ser またはその断片を、それぞれ示す]で示さ れるポリペプチドからなる請求項3記載のグリア活性化 因子。

【請求項5】アミノ酸配列：

(Met)n X₃ Ser Asp His Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly Gly Leu Pro Arg Gly
Pro Ala Val Thr Asp Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg
Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly
Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu
Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser
Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu
Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg
Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val
Asp Pro Asp Lys Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Ile Leu Ser Gln Ser

[ただしnは0または1を、X₃はAla Pro もしくは Le u Gly Glu Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala V al Pro Phe Gly Asn Val Pro Val Leu Pro Val Asp Ser Pro Val Leu Leu またはその断片を、それぞれ示す]で示さ れるポリペプチドからなる請求項3記載のグリア活

性化因子。

【請求項6】グリア活性化因子をコードするポリヌクレオチドを含有するDNA。

【請求項7】ポリヌクレオチドが塩基配列：

TTG GATCATTAA AGGGGATTCT
CAGGCCGAGG CAGCTACT GCAGGACTGG ATTCACTTA GAAATCTTCC CCAATGGTAC
TATCCAGGGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTTGGCATT CTGGAATTAA TCAGTATAGC

AGTGGGCTG GTCAGCATTG GAGGGTGGG CAGTGGACTC TACCTCGGG AATGAGAA
GGGGGAGCTG TATGGATCG AAAACTAAC CCAAGAGTGT GTATTCAAG AACAGTTCGA
AGAAAATGG TATAATACGT ACTCGTCAA CCTATATAAG CACGTGGACA CTGGAAGGGC
ATACTATGTT GCATTAATAA AAGATGGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CAAACGGCA
CCAGAAATT ACACATTTT TACCTAGACC AGTGGACCCC GAC

で示されるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドである請求項6記載のDNA。

【請求項8】ポリヌクレオチドが塩基配列：

Y₁-TTG GATCATTAA AGGGGATTCT
CAGGCGGAGG CAGCTATACT GCAGGACTGG ATTCACTTA GAAATCTTCC CCAATGGTAC
TATCCAGGGG ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTTGGCATT CTGGAATTAA TCAGTATAGC
AGTGGGCTG GTCAGCATTG GAGGGTGGG CAGTGGACTC TACCTCGGG AATGAGAA
GGGGGAGCTG TATGGATCG AAAACTAAC CCAAGAGTGT GTATTCAAG AACAGTTCGA
AGAAAATGG TATAATACGT ACTCGTCAA CCTATATAAG CACGTGGACA CTGGAAGGGC
ATACTATGTT GCATTAATAA AAGATGGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CAAACGGCA
CCAGAAATT ACACATTTT TACCTAGACC AGTGGACCCC GAC-Y₂

(ただし、Y₁は GCTCCCTTA GGTGAAGTTT GGAACATATT CGG
TGTGCAG GATGCCGTAC CGTTTGGAA TGTGCCGTG TTGCCGTG
G ACAGCCCGGT TTTGTTAAGT GACCACCTGG GTCAGTCCGA AGCA
GGGGG CTCCCCAGGG GACCCGCAGT CACGGAC またはその断片を、Y₂は AAAGTAC CTGAACTGTA TAAGGATATT CTAAGCCAAA

GT またはその断片を、それぞれ示す] ないしその5'末端に開始コドンATG を含有する塩基配列で示されるポリヌクレオチドである請求項6記載のDNA。

【請求項9】ポリヌクレオチドが塩基配列：

Y₃-AGT GACCACCTGG GTCAGTCCGA
AGCAGGGGGG CTCCCCAGGG GACCCGCAGT CACGGACTTG GATCATTAA AGGGGATTCT
CAGGCGGAGG CAGCTATACT GCAGGACTGG ATTCACTTA GAAATCTTCC CCAATGGTAC
TATCCAGGGG ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTTGGCATT CTGGAATTAA TCAGTATAGC
AGTGGGCTG GTCAGCATTG GAGGGTGGG CAGTGGACTC TACCTCGGG AATGAGAA
GGGGGAGCTG TATGGATCG AAAACTAAC CCAAGAGTGT GTATTCAAG AACAGTTCGA
AGAAAATGG TATAATACGT ACTCGTCAA CCTATATAAG CACGTGGACA CTGGAAGGGC
ATACTATGTT GCATTAATAA AAGATGGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CAAACGGCA
CCAGAAATT ACACATTTT TACCTAGACC AGTGGACCCC GACAAAGTAC CTGAACTGTA
TAAGGATATT CTAAGCCAAA GT

(ただし、Y₃は GCTCCCTTA GGTGAAGTTT GGAACATATT CGG
TGTGCAG GATGCCGTAC CGTTTGGAA TGTGCCGTG TTGCCGTG
G ACAGCCCGGT TTTGTTAAGT GACCACCTGG GTCAGTCCGA またはその断片を示す] ないしその5'末端に開始コドンATG を含有する塩基配列で示されるポリヌクレオチドである請求項6記載のDNA。

【請求項10】請求項6記載のDNAを含有するベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項11】請求項10記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中にグリア活性化因子を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする該因子の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はグリオーマ細胞培養液より得られ、グリア細胞、線維芽細胞等に対して増殖促進作用を示す、新規なポリペプチドであるグリア活性化因子、該因子をコードするDNA、および該因子製造のための組換えDNAに関する。

【0002】

【従来の技術】細胞成長因子は、多種のものが発見、研究され、活用されてきている（細胞成長因子 part II、

日本組織培養学会編、1987、朝倉書店）。たとえば、上皮細胞成長因子（EGF, Epidermal Growth Factor）、血小板由来成長因子（PDGF, Platelet-Derived Growth Factor）や酸性あるいは塩基性線維芽細胞増殖因子（aFGFもしくはbFGF, acidic or basic Fibroblast Growth Factor）などである。これらは、いずれも線維芽細胞株の増殖促進を指標として単離されてきたものであり、その作用スペクトラムは広いが、特異性に乏しい。近年、機能分化した細胞に特異的に作用する増殖因子を探す努力が試みられつつあり、ケラチノサイト成長因子（KGF Keratinocyte Growth Factor）、肝実質細胞成長因子（HGF Hepatocyte Growth Factor）等が単離され、その特異的な作用スペクトラムから疾患への適用が期待されている。脳神経細胞は、生後すぐに増殖を止め、以後、その数を減じて行く。近年、老年での脳疾患、特に痴呆症が問題となってきたが、これは、原因不明、あるいは損傷等による脳神経細胞の死滅によることが判ってきた。このような脳神経細胞の死滅を防ぎ止めるためには、これらの細胞を賦活化することが必要である。グリア細胞は脳内で神経細胞

のまわりをとり囲んでおり、脳神経細胞の生存を支持している。グリア細胞が放出しているであろう神経栄養因子の探索は、きわめて広く行われてきたが、まだ決定的な因子は見出されていない。グリア細胞は、その形態、および働きから、I型アストロサイト、II型アストロサイト、オリゴデンドロサイト等に分類されている。これらのグリア細胞を賦活化することは、それ自身では分裂増殖することのない脳神経細胞を賦活、維持することとなり、脳疾患改善の重要な方策となってきた。このため、脳神経細胞のみならず、グリア細胞に作用する増殖因子は渴望されてきた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】前記のように、グリア細胞に作用する増殖因子は、脳神経細胞の賦活化を目指して、探索されており、PDGF、FGF等が、グリア細胞に対しても増殖促進作用を示すことが知られている。しかし、これらの因子は、他の細胞種に対する増殖促進作用も強く、思うように医薬品として使用され得てはいない。グリア細胞に、より特異的に作用している因子を探し、これを医薬品として活用することは脳疾患の改善の方策として期待されていたが、今まで、このような因子は得られていない。

【0004】

【課題を解決するための手段】一般的に、多くの細胞は自己自身の増殖を促す増殖促進因子を產生していることが知られるようになってきた。そこで本発明者らは、グリア細胞が產生する、グリア細胞に対する増殖促進因子について探索した。この結果、グリア細胞が該因子を產生していることを見出したが、ヒト・グリア細胞をヒトから採取することはできず、また、一般にそのままで維

(3) アミノ酸配列：

Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg
Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly
Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu
Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser
Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu
Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg
Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val
Asp Pro Asp

で示されるポリペプチドを含むグリア活性化因子または

持、培養できる細胞はない。そこで、グリア細胞としての形質を残しているグリオーマ細胞株を用いて検討を重ね、この因子（グリア活性化因子、GliaActivating Factor, 以下GAFと略称することがある。）を単離、精製した。

【0005】一方、ヒトグリオーマ細胞より得られたGAFは極めて微量であり、医薬品として、あるいは研究材料として使用するため充分な量を得るには、大量のグリア細胞を培養するための時間と労力が必要とされる。そこで本発明者等は、さらにGAFをより簡便に得るために、GAFをコードするポリヌクレオチドを同定し、該ポリヌクレオチドを用いて近年発展してきた組み換えDNA技術を応用することにより、この問題を解決することも考えた。すなわち、本発明者らは、GAFのN末端側アミノ酸配列を解析し、この配列を基にオリゴヌクレオチドプローブを合成した。ヒトグリオーマ細胞NM C-G1, あるいはヒト包皮由来初代培養細胞のmRNAより作製したcDNAライブラリーについて上記プローブを用いて検索し、ヒトGAF cDNAをクローニングした。さらに、該cDNAを含む組み換えDNAを構築し、該DNAで形質転換された形質転換体を培養すると、ヒトGAFが生産されることを見出した。本発明者らは、これらの知見に基づき、さらに研究した結果、本発明を完成した。

【0006】本発明は（1）グリオーマ細胞培養液より得られ、かつグリア細胞増殖促進活性を有する蛋白質であるグリア活性化因子、（2）グリオーマ細胞がヒトグリオーマ細胞である上記（1）記載のグリア活性化因子、

(4) アミノ酸配列：

(Met)n-X₁-Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg
Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly
Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu
Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser
Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu
Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg

該因子作用を有するそのムテイン、

Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val
Asp Pro Asp -X₂

[ただし n は 0 または 1 を、 X₁ は Ala Pro Leu Gly Glu
Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala Val Pro P
he Gly Asn Val Pro Val Leu Pro Val Asp Ser Pro Val
Leu Leu Ser Asp His Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly G
ly Leu Pro Arg Gly Pro Ala Val Thr Asp またはその

断片を、 X₂ は Lys Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Ile
Leu Ser Gln Ser またはその断片を、それぞれ示す】で
示されるポリペプチドからなる上記（3）記載のグリア
活性化因子、

（5）アミノ酸配列：

(Met)n X₃ Ser Asp His Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly Gly Leu Pro Arg Gly
Pro Ala Val Thr Asp Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg
Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly
Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu
Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser
Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu
Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg
Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val
Asp Pro Asp Lys Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Ile Leu Ser Gln Ser

[ただし n は 0 または 1 を、 X₃ は Ala Pro もしくは Le
u Gly Glu Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala V
al Pro Phe Gly Asn Val Pro Val Leu Pro Val Asp Ser

Pro Val Leu Leu またはその断片をそれぞれ示す】で示
されるポリペプチドからなる上記（3）記載のグリア活
性化因子、

（6）アミノ酸配列：

X₁' X₂' Ser Asp His Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly Gly Leu Pro Arg Gly
Pro Ala Val Thr Asp Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg
Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly
Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu
Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser
Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu
Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg
Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val
Asp Pro Asp Lys Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Ile Leu Ser Gln Ser

[ただし、 X₁' は Met または Met Ala Pro を、 X₂' は
Leu Gly Glu Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala
Val Pro Phe Gly Asn Val Pro Val Leu Pro Val Asp Se
r Pro Val Leu Leu またはその断片をそれぞれ示す】で

示されるポリペプチドからなる上記（5）記載のグリア
活性化因子、（7）グリア活性化因子をコードするポリ
ヌクレオチドを含有するDNA、

（8）ポリヌクレオチドが塩基配列：

TTG GATCATTAA AGGGGATTCT
CAGGCAGGAGG CAGCTATACT GCAGGACTGG ATTCACCTTA GAAATCTTCC CCAATGGTAC
TATCCAGGGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTTGGCATC CTGGAATTAA TCAGTATAGC
AGTGGGCCTG GTCAGCATTG GAGGGTGGA CAGTGGACTC TACCTCGGGA TGAATGAGAA
GGGGGAGCTG TATGGATCAG AAAAACAAC CCAAGAGTGT GTATTCAGAG AACAGTTCGA
AGAAAACCTGG TATAATACGT ACTCGTCAAA CCTATATAAG CACGTGGACCA CTGGAAGGCC
ATACTATGTT GCATTAATAA AAGATGGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CTAACGGCA
CCAGAAATTC ACACATTTT TACCTAGACC AGTGGACCCC GAC

で示されるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチ

ドである上記（7）記載のDNA、

（9）ポリヌクレオチドが塩基配列：

Y_1 -TTG GATCATTAA AGGGGATTCT
CAGGCGGAGG CAGCTATACT GCAGGACTGG ATTCACCTTA GAAATCTTCC CCAATGGTAC
TATCCAGGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTGGCATT CTGGAATTAA TCAGTATAGC
AGTGGGCCTG GTCAGCATTG GAGGGTGGGA CAGTGGACTC TACCTCGGGA TGAATGAGAA
GGGGGAGCTG TATGGATCAG AAAAACAAC CCAAGAGTGT GTATTCAAG AACAGTTCGA
AGAAAATGG TATAATACGT ACTCGTCAA CCTATATAAG CACGTGGACA CTGGAAAGGCG
ATACTATGTT GCATTAATA AAGATGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CAAACGGCA
CCAGAAATTC ACACATTTT TACCTAGACC AGTGGACCCC GACAAAGTAC CTGAACGT

[ただし、 Y_1 は GCTCCCTTA GGTGAAGTTG GGAACATTT CGG
TGTGCAG GATGCCGTAC CGTTGGAA TGTGCCGTG TTGCCGTG
G ACAGCCCGGT TTTGTTAAGT GACCACCTGG GTCAGTCCGA AGCA
GGGGG CTCCCCAGGG GACCCGCAGT CACGGAC またはその断片を示す]

を、 Y_2 は AAAGTAC CTGAACGT TAAGGATATT CTAAGCCAAA
GT またはその断片を、それぞれ示す] ないしその 5' 末端に開始コドン ATG を含有する塩基配列で示されるポリヌクレオチドである上記 (7) 記載の DNA、

(10) ポリヌクレオチドが塩基配列：

Y_3 -AGT GACCACCTGG GTCAGTCCGA
ACCAGGGGGG CTCCCCAGGG GACCCGCAGT CACGGACTTG GATCATTAA AGGGGATTCT
CAGGCGGAGG CAGCTATACT GCAGGACTGG ATTCACCTTA GAAATCTTCC CCAATGGTAC
TATCCAGGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTGGCATT CTGGAATTAA TCAGTATAGC
AGTGGGCCTG GTCAGCATTG GAGGGTGGGA CAGTGGACTC TACCTCGGGA TGAATGAGAA
GGGGGAGCTG TATGGATCAG AAAAACAAC CCAAGAGTGT GTATTCAAG AACAGTTCGA
AGAAAATGG TATAATACGT ACTCGTCAA CCTATATAAG CACGTGGACA CTGGAAAGGCG
ATACTATGTT GCATTAATA AAGATGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CAAACGGCA
CCAGAAATTC ACACATTTT TACCTAGACC AGTGGACCCC GACAAAGTAC CTGAACGT
TAAGGATATT CTAAGCCAAA GT

[ただし、 Y_3 は GCTCCCTTA GGTGAAGTTG GGAACATTT CGG
TGTGCAG GATGCCGTAC CGTTGGAA TGTGCCGTG TTGCCGTG
G ACAGCCCGGT TTTGTTA またはその断片を示す] ないし

その 5' 末端に開始コドン ATG を含有する塩基配列で示されるポリヌクレオチドである上記 (7) 記載の DNA、

(11) ポリヌクレオチドが塩基配列：

Y' -AGT GACCACCTGG GTCAGTCCGA
ACCAGGGGGG CTCCCCAGGG GACCCGCAGT CACGGACTTG GATCATTAA AGGGGATTCT
CAGGCGGAGG CAGCTATACT GCAGGACTGG ATTCACCTTA GAAATCTTCC CCAATGGTAC
TATCCAGGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTGGCATT CTGGAATTAA TCAGTATAGC
AGTGGGCCTG GTCAGCATTG GAGGGTGGGA CAGTGGACTC TACCTCGGGA TGAATGAGAA
GGGGGAGCTG TATGGATCAG AAAAACAAC CCAAGAGTGT GTATTCAAG AACAGTTCGA
AGAAAATGG TATAATACGT ACTCGTCAA CCTATATAAG CACGTGGACA CTGGAAAGGCG
ATACTATGTT GCATTAATA AAGATGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CAAACGGCA
CCAGAAATTC ACACATTTT TACCTAGACC AGTGGACCCC GACAAAGTAC CTGAACGT
TAAGGATATT CTAAGCCAAA

[ただし、 Y' は AT GGCTCCCTTA GGTGAAGTTG GGAACATTT CGG
CGGTGTGCAG GATGCCGTAC CGTTGGAA TGTGCCGTG TTGCCGTG
GACAGCCCGGT TTTGTTA またはその断片を示す] で示されるポリヌクレオチドである上記 (10) 記載の DNA、(12) 上記 (7) 記載の DNA を含有するベクターで形質転換された形質転換体、(13) 上記 (12) 記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中にグリア活性化因子を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする該因子の製造法に関するものである。

【0007】本発明の GAF は第一にヒト由来グリオーマ細胞株または上記 (6) の形質転換体を培養して得られた培養液上清からグリア細胞増殖活性を指標として単離された蛋白質からなり、かつグリア細胞、線維芽細胞

に増殖促進活性を有するグリア活性化因子を要旨とする。更に本発明の GAF は、次の特徴を有する：

(a) ヘパリン親和性を有する (ヘパリンセファロースカラムより 0.4~0.9M 食塩濃度で溶出される。)。

(b) 分子量： SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で測定して、 25000、 29000、 30000 の三種の分子種がある。

(c) 活性の安定性： 100°C、 5 分の熱処理で活性を失い、また pH 2、 30 分処理で部分的に活性を失う。

(d) 抗原性： 血小板由来成長因子 (PDGF)、酸性線維芽細胞増殖因子 (aFGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) との間に免疫学的交差性を示さない。

い。

(e) 生物活性：グリア細胞、線維芽細胞、ラット副腎髓質褐色細胞腫由来PC-12細胞、に対して増殖促進活性を示す。

本発明のGAFは、分子量25000、29000、30000の三種の分子種があり、それぞれの分子種が一つの蛋白質であり、いずれも同等の生物活性を有していると認められる。

【0008】本発明において、さらにヒト由来グリオーマ細胞株または上記(6)の形質転換体を培養し、その培養上清よりグリア活性化因子を採取し、それを精製することを特徴とするGAFの製造法が提供される。本発明によるGAFを得るための該因子を含む細胞培養上清は、グリオーマ細胞、例えばヒトグリオーマ細胞NMC-G1の培養により得られる。グリオーマ細胞の培養には静置培養、ローラボトル培養、セルファクトリーあるいは懸濁培養等のいかなる方法も用いられるが、好ましくはローラボトル培養が用いられる。培地としては動物細胞用の培地、例えば、MEM培地、〔サイエンス(Science), 122, 501(1952)〕、DMEM培地〔ヴィロロジー(Virology), 8, 396(1959)〕、RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(Journal of the American Medical Association), 199, 519(1967)〕、199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73, 1(1950)〕などが挙げられ、好ましくは、DMEM培地が用いられる。培養にはこれにさらに約10～20%の胎児牛血清を添加しても良い。pHは約6～8であるのが好ましい。培養温度は30～40℃、好ましくは37℃で約24～100時間行い、必要に応じて培地交換を行う。

【0009】上記培養液よりGAF蛋白を分離精製するには、自体公知の分離精製法を適切に組み合わせて行うことが出来る。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィー、等電点電気泳動法などの荷電の差を利用する方法、アフィニティーコロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法などが挙げられる。さらに具体的には、上記培養液を遠心分離して夾雜沈澱物を除いた後、ヘパリンセファロースクロマトグラフィーに付し、GAF蛋白を吸着、溶出することにより、効率よく該蛋白の濃縮、精製を行うことが出来る。

【0010】セファクリルS-200等を担体としたゲルろ過もGAF蛋白の精製に有効である。例えば、ヘパリンセファロースカラムで濃縮されたGAF蛋白を含む

溶出液を、さらに限外ろ過法などを用いて濃縮してセファクリルS-200カラムを用いるクロマトグラフィーに付し、中性付近の緩衝液で溶出する。CMセルロース等の酸性樹脂のカラムクロマトグラフィーも有効である。たとえば、弱酸性緩衝液で平衡化したカラムを用いて、同じ緩衝液で透析した試料をクロマトグラフィーに付し、NaCl等の塩の直線濃度勾配溶出を行うことができる。また、ヘパリンセファロースを担体としたアフィニティーコロマトグラフィーは極めて有効である。例えば、中性付近のトリス塩酸あるいはトリスリン酸などの緩衝液で平衡化したヘパリンセファロースカラムを用いて、GAF蛋白を含む溶液をクロマトグラフィーに付し、十分洗った後、NaClなどの塩の直線濃度勾配溶出を行うことによりGAF蛋白を精製することができる。特に高速液体クロマトグラフィー用に開発されたヘパリンカラム(例えばShodex A F pak HR-894、昭和電工製など)は有効であり、前記ヘパリンセファロースと同様に利用することが出来る。逆相高速液体クロマトグラフィーは、多くの蛋白の精製に威力を發揮しており、GAF蛋白もこの担体を用いて精製することができる。例えば試料を0.1%トリフルオロ酢酸を含む溶液としてカラムにかけ、0.1%トリフルオロ酢酸に加えたアセトニトリルの濃度勾配によって溶出を行うことができる。上記の操作を適宜、組み合わせることによりGAF蛋白を均一な標品として回収することができる。また、精製過程、あるいは保存過程での微量のディタージェントの共存は、標品の担体、あるいは容器への非特異的吸着を防ぐのに好適である。ディタージェントとしてはCHAPS(3-(3-Cholamidopropyl)dimethyl ammonio)1-propanesulfonate)、NP-40、Triton X-100などが挙げられるが、特にCHAPSが好ましい。

【0011】培養上清中および精製過程でのGAF蛋白の活性は、例えばラット胎児(19日令)脳より分離採取した初代培養グリア細胞、あるいは公知のBALB/c 3T3細胞に対する³H-チミジンのとりこみを指標とした増殖促進効果などにより測定することができる。得られた精製標品は透析、凍結乾燥を行い、乾燥粉末とすることもできる。さらに血清アルブミンなどを添加して保存することも好適である。得られた精製標品を用いて、GAF蛋白の糖鎖構造を調べることができる。この目的のためにはレクチンを用いたブロッティングや糖鎖分解酵素などが使用され得る。得られた精製標品は、そのままN末端側アミノ酸配列を調べることができる。また、蛋白分解酵素、たとえば、トリプシン、リジルエンドペプチダーゼ、V8プロテアーゼ等で分解処理したのち、生じたペプチド断片を逆相高速液体クロマトグラフィーを用いて分取し、それぞれについて、アミノ酸配列を調べることが出来る。アミノ酸配列の決定には自動アミノ酸配列分析計(例えばモデル470A アプライド

バイオシステムズ、米国)が特に有効に使用される。

【0012】得られたアミノ酸配列をもとに、対応する核酸の塩基配列を求め、オリゴヌクレオチドを合成してGAF蛋白をコードしているcDNAのクローニングに用いることが出来る。

【0013】cDNAを得られれば、このcDNAを微生物、例えば大腸菌、枯草菌、イーストなどで発現させて、GAF蛋白をより容易に得ることができる。また、発現宿主としては動物培養細胞も用いられ、糖鎖構造が必要な場合には、きわめて好適な宿主として用いられることがある。この様に遺伝子工学的手法を用いることにより、より容易にGAF蛋白の大量生産への道を開くことができる。この様な遺伝子工学的手法によりGAFを得る場合、発現宿主の相違または突然変異等によるアミノ酸の欠損、置換等によりここに示すアミノ酸配列が異なることがあるが、このような蛋白であっても、GAF因子作用を有するものであれば、本発明のGAFに含まれる。また、グリオーマ細胞の培養上清から精製されたGAFに、N末端側アミノ酸配列が消失した分子種が存在し、それらが同じ比活性を有していたことからもわかる様に、GAFのアミノ酸配列の一部を消失させる、あるいは他の配列を付加する、さらにはアミノ酸配列の一部を置換しても同等の活性を保持させることは可能である。遺伝子工学的手法を用いて、このような変異GAF蛋白をつくり、熱や酸に対する安定性を高めること等も可能である。

【0014】本発明のヒトグリア活性化因子(1)のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有する発現ベクターは、例えば(イ)ヒトグリア活性化因子(1)を培養上清より単離精製し、N末端側アミノ酸配列を分析する、(ロ)得られたアミノ酸配列を基に、それをコードするオリゴヌクレオチドプローブを合成する、(ハ)ヒトグリア活性化因子をコードするRNAを細胞より抽出し、(ニ)該mRNAから単鎖の相補DNA(cDNA)を、次いで二重鎖DNAを合成し、(ホ)該相補DNAをファージまたはプラスミドに組み込み、(ヘ)得られた組み換えファージまたはプラスミドで宿主を形質転換し、(ト)得られた形質転換体を培養後、形質転換体から適当な方法、例えばDNAプローブを用いたハイブリダイゼーション法により目的とするDNAを含有するファージあるいはプラスミドを単離し、(チ)その組み換えDNAから目的とするクローン化DNAを切り出し、(リ)該クローン化DNAまたはその一部を発現ベクター中のプロモーターの下流に連結する、ことにより製造することができる。

【0015】ヒトGAFをコードするmRNAは、種々のグリア活性化因子産生細胞、例えばヒトグリオーマ細胞、あるいはヒト線維芽細胞などから得る事ができる。該ヒトグリオーマ細胞としてはNMC-G1、またヒト線維芽細胞としてはWI-38(ATCC番号CCL-

75)などが挙げられる。上記細胞NMC-G1は平成2年10月31日から財団法人発酵研究所(IFO)に受託番号IFO 50281として、また平成3年2月21日から通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所(FRI)に受託番号FERM BP-3294としてそれぞれ寄託されており、またWI-38はジ・アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(The American Type Culture Collection)発行のカタログ・オブ・セル・ラインズ・アンド・ハイブリドーマズ第5版(Catalogue of Cell Lines & Hybridomas, 5th edition), 1985に掲載されている。

【0016】GAF産生細胞からRNAを調製する方法としては、グアニジンチオシアネート法[(ジェー・エム・チルグウィン(J.M. Chirgwin)ら、バイオケミストリー(Biochemistry), 18, 5294(1979)]などが挙げられる。このようにして得られたmRNAを鋳型とし、逆転写酵素を用いて、例えば岡山(H. Okayama)らの方法[モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Molecular and Cellular Biology)2, 161(1982)および同誌3, 280(1983)]に従いcDNAを合成し、得られたcDNAをプラスミドに組み込む。cDNAを組み込むプラスミドとしては、たとえば大腸菌由来のpBR322[ジーン(gene), 2, 95(1977)], pBR325[ジーン, 4, 121(1978)], pUC12[ジーン, 19, 259(1982)], pUC13[ジーン, 19, 259(1982)]、pUC118, pUC119, 枯草菌由来のpUB110[バイオケミカル・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション(Biochemical and Biophysical Research Communication), 112, 678(1983)]などが挙げられるが、その他のものであっても、宿主内で複製増殖されるものであれば、いずれをも用いることができる。

【0017】プラスミドに組み込む方法としては、たとえば、ティー・マニアティス(T. Maniatis)ら、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ(Cold Spring Harbor Laboratory), 第239頁(1982)に記載の方法などが挙げられる。またファージベクターにcDNAを組み込む方法としては、たとえばヒューン(Hyunh, T. V.)らの方法[ディー・エヌ・エークローニング ア プラクティカル アプローチ(DNA Cloning, A Practical Approach)1, 49(1985)]などが挙げられる。上記cDNAが組み込まれたプラスミドの例としては、ヒト正常2倍体細胞mRNAより合成したcDNAをベクター、たとえばpCDベクター[Okayamaら、モレキュラー・セル・バイオロジー(Molecular Cell Biology), 3, 280(1983)参照]を宿主(たとえば、大腸菌x1776)に組み込んで作成してもよい。

【0018】このようにして得られたプラスミドは、適当な宿主たとえばエシェリキア(Escherichia)属菌、バチルス(Bacillus)属菌などに導入する。上記エシェリキア属菌の例としては、エシェリキア・コリ(Escheri

chia coli) K12DH1 [プロシージング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)60, 160(1968)], M103 [ヌクレオティック・アシッズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9, 309(1981)], J A 221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology)], 1 20, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー41, 459(1969)], C 600 [ジェネティックス(Genetics), 39, 440(1954)]などが挙げられる。上記バチルス属菌としては、たとえばバチルス・サチリス(Bacillus subtilis) M1114(ジーン, 24, 255(1983), 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(Journal of Biochemistry)95, 87(1984)]などが挙げられる。

【0019】プラスミドで宿主を形質転換する方法としては、たとえばティー・マニアティス(T. Maniatis)ら、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning), コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory), 第249頁(1982)に記載のカルシウムクロライド法あるいはカルシウムクロライド/ルビジウムクロライド法などが挙げられる。このようにして得られた形質転換体中からGAFのアミノ酸配列を基に合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして、自体公知の方法、たとえばコロニー・ハイブリダイゼーション法[ジーン(Gene) 10, 63(1980)]およびDNA塩基配列決定法[プロシージング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)74, 560(1977)、ヌクレオティック・アシッズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9, 309(1981)]を用い求めるクローンを選出す。このようにして、クローン化されたGAFをコードする塩基配列を含有するDNAを有するベクターを保持する微生物が得られる。

【0020】上記クローン化されたGAFをコードするcDNAを有するプラスミドは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化して使用することが出来る。クローン化されたcDNAから発現させたい領域を切り出し、発現に適したビーカー(ベクター)中のプロモーターの下流に連結して発現型ベクターを得ることができる。ベクターとしては、上記の大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13), 枯草菌由来プラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194), 酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15), あるいはλファージなどのバクテリオファージおよびレトロウィルス、ワクシニアウィルスなどの動物ウィルスなどが挙げられる。

【0021】該cDNAはその5'末端に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端には翻訳終止コドンとしてのTAA, TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもで

きる。さらに該DNAを発現させるにはその上流にプロモーターを接続する。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。形質転換する際の宿主がエシェリキア属菌である場合は、T7プロモーター, trpプロモーター, lacプロモーター, recAプロモーター, λPLプロモーター, λppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター, SPO2プロモーター, penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター, PGKプロモーター, GAPプロモーター, ADHプロモーターなどが好ましい。とりわけ宿主がエシェリキア属菌でプロモーターがT7プロモーターまたはtrpプロモーターであることが好ましい。宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウィルスのプロモーターなどが挙げられ、とりわけSV40由来のプロモーターが好ましい。

【0022】このようにして構築されたGAFをコードするcDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造する。宿主としては、たとえばエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、動物細胞などが挙げられる。上記エシェリヒア属菌、バチルス属菌の具体例としては、前記したものと同様のものが挙げられる。上記酵母としては、たとえばサッカロマイセスセレビシエ(Saccharomyces cerevisiae) AH22R+, NA87-11A, DKD-5Dなどが挙げられる。動物細胞としては、たとえばサル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO, マウスL細胞, ヒトFL細胞などが挙げられる。

【0023】上記エシェリキア属菌を形質転換するには、たとえばプロシージング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 69, 2110(1972)やジーン, 17, 107(1982)などに記載の方法に従って行なわれる。バチルス属菌を形質転換するには、たとえばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス(Molecular & General Genetics), 168, 111(1979)などに記載の方法に従って行なわれる。酵母を形質転換するには、たとえばプロシージング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 75, 1929(1978)に記載の方法に従って行なわれる。動物細胞を形質転換するには、たとえばヴィロロジー(Virology) 52, 456(1973)に記載の方法に従って行なわれる。

【0024】このようにして、GAFをコードするcDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体が得られる。その一例としては、たとえば後述の実施例5で得られたEscherichia coli DH-1/pGAF1が挙げられ、該微生物は、平成3年8月28日に財団法人発酵研究所(IFO)に受託番号IFO

15217として寄託されており、また通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所(FRI)に平成3年9月2日から受託番号FERM BP-3547としてそれぞれ寄託されている。また実施例8で得られたEscherichia coli MM294(DE3)/pLysS, pETGAF1は、平成3年12月3日に財団法人発酵研究所(IFO)に受託番号IFO 15248として寄託されており、また通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所(FRI)に平成3年12月24日から受託番号FERM BP-3689としてそれぞれ寄託されている。

【0025】宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としてはたとえば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8がほしい。エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、たとえばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー(Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス(Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕がほしい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、たとえば3β-インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。

【0026】宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえばパークホールダー(Burkholder)最小培地〔Bostian, K. L. ら、「プロシージング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 77, 4505(1980)〕が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのがほしい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス(Science) 122, 501(1952)〕、DMEM培地〔ヴィロロジー(Virology), 8, 396(1959)〕、RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(The Journal of the American Medical Association) 199, 51

9(1967)〕、199培地〔プロシージング・オブ・ザ・サイエンティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine) 73, 1 (1950)〕などが挙げられる。pHは約6~8であるのがほしい。培養は通常約30℃~40℃で約1.5~60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0027】上記培養物からGAFを分離精製するには、例えば下記の方法により行うことができる。GAFを培養菌体あるいは細胞から抽出する際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを緩衝液あるいは塩酸グアニンなどの蛋白質変性剤を含む液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解によって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離によりGAFを得る方法などが適宜用い得る。

【0028】抽出液よりのGAFの精製は通常の精製方法が用いられ得る。例えば硫酸による分画、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、ゲルろ過など、いずれを用いてもよい。また精製過程での蛋白分解酵素阻害剤の共存は、分解を受けていない蛋白を得るのに好適である。また精製過程での緩和な表面活性剤の共存は、収量を高めるのに好都合である。たとえばCHAPSなどはほしい。天然型GAFの精製に用いたヘパリンカラムは極めて有効に使用される。これらを組み合わせることにより、均一なGAF蛋白を得ることができる。ここに製造されるGAFはグリア細胞に対する増殖促進活性を有するので、脳の損傷等の治癒促進剤として用いることができる。また脳神経細胞損傷による疾患、脳浮腫、アルツハイマー病、老人性痴呆、さらには糖尿病性網膜症などへの応用もできる。他の細胞への作用に比べて、グリア細胞に対する作用が強いので、グリア細胞を特異的に賦活することが期待できる。また、線維芽細胞に対する増殖促進作用を有することから、火傷、創傷、術後組織潰瘍、消化器潰瘍の治癒促進剤として用いることができる。また、GAFは巨核芽球に作用して、この細胞を増殖分化させ、血小板増加を促すことが見出された。他の造血系あるいは免疫担当の細胞の増殖も促進するものと考えられる。特に脳内では免疫担当細胞としてミクログリアが存在しており、この細胞の賦活にも関与しているものと考えられる。この点からも脳損傷の治療改善に用いることができよう。GAFはヒト細胞由来血管内皮細胞にはほとんど作用しなかったが、血管平滑筋細胞には増殖促進作用を有している。

【0029】さらに他の増殖因子、aFGF、bFGF、IGFなどと同様に骨形成を促進する作用も期待され、骨折や骨粗鬆症への適用も考えられる。GAF cDNAはbFGF、TGF- α 、PDGFなどと同様に線維芽細胞を形質転換することができる。この性質から、GAFの上昇が細胞内での転写グリオーマの悪性化

の一因となっていることも考えられる。従って、脳腫瘍ではGAFの産生が促進されていると考えられるので、GAFおよびその抗体さらにはGAF cDNAは腫瘍の診断にも有用となろう。またグリア細胞の培養研究には、有効な因子として活用され得る。

【0030】本発明のGAFを医薬として用いるには、そのまま粉末として、または他の薬理学的に許容される担体、賦形剤、希釈剤とともに医薬組成物（例えは、注射剤、錠剤、カプセル剤、液剤、軟膏など）として、温血哺乳動物（例、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、犬、ネコ）に対して非経口的または経口的に安全に投与することができる。注射剤の製剤化はたとえば生理食塩水またはブドウ糖やその他の補助薬を含む水溶液を用い、常法に従って行なわれる。錠剤、カプセル剤等の医薬組成物も常法に従って調製しうる。さらに、医薬組成物としての注射剤、液剤、錠剤、カプセル剤等を製造する際には、無菌条件下で行なう。本発明のGAFを上記した医薬として用いる場合には、たとえば上記した温血動物に、投与ルート、症状などを考慮して、1回約0.5ngないし50μg/kg、1日量約1ngないし100μg/kgの中から適当量を選んで投与される。また、本発明のGAFを細胞培養を促進させるための試薬として用いる場合、培地1リットルあたり約0.01～10μgさらに好ましくは約0.1～10μgとなるように培地に加えることが好ましい。

【0031】本発明明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければ一体を示すものとする。

【0032】DNA：デオキシリボ核酸

cDNA：相補的デオキシリボ核酸

A：アデニン

T：チミン

G：グアニン

C：シトシン

RNA：リボ核酸

mRNA：メッセンジャーリボ核酸

dATP：デオキシアデノシン三リン酸

dTTP：デオキシチミジン三リン酸

dGTP：デオキシグアノシン三リン酸

dCTP：デオキシシチジン三リン酸

ATP：アデノシン三リン酸

EDTA：エチレンジアミン四酢酸

SDS：ドデシル硫酸ナトリウム

GlyまたはG：グリシン

AlaまたはA：アラニン

VaiまたはV：バリン

L e uまたはL	：ロイシン
I leまたはI	：イソロイシン
S erまたはS	：セリン
T hrまたはT	：スレオニン
C ysまたはC	：システイン
M etまたはM	：メチオニン
G luまたはE	：グルタミン酸
A spまたはD	：アスパラギン酸
L ysまたはK	：リジン
A rgまたはR	：アルギニン
H isまたはH	：ヒスチジン
P heまたはF	：フェニールアラニン
T yrまたはY	：チロシン
T rpまたはW	：トリプトファン
P roまたはP	：プロリン
A snまたはN	：アスパラギン
G lnまたはQ	：グルタミン

【0033】

【実施例】以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

参考例1 グリア細胞に対する増殖促進活性の測定

ラット胎児脳より調製したグリア初代培養細胞を非効化したウシ胎児血清を10%含むDMEM培地に3×10⁴個/mlとなるように浮遊させた。その細胞浮遊液100μlを96穴の平底マイクロプレート(A/N Nunc社製、Roskilde、デンマーク)の各ウエルに入れ2～3日間の培養後、各ウエルより75μlの培地を廃棄し、各ウエルに血清を含まないDMEM培地175μlを添加した。さらに2～3日間培養した後、各ウエルより20μlの培地を廃棄した。その後非効化したウシ胎児血清を1.25%含むDMEM培地で適当に希釈したテストサンプルの20μlを各ウエルに添加後、一晩培養した。翌朝、各ウエルに1μCiのトリチウムチミジン(5Ci/mmol、1mCi/ml、RCC Amersham)を添加後、さらに5～7時間培養した。培養後、各ウエルの培地を廃棄後、各ウエルに100μlの0.5%トリプシンと0.01%EDTAを含むPBSを添加し、数分の間室温にて放置した。顕微鏡でグリア細胞が浮遊していることを確認した後、浮遊細胞をタイターテックセルハーベスター(Flow Laboratories社製、Virginia, U.S.A.)を用いてガラスファイバーフィルター(大日本製薬株式会社製)上に集め水で洗浄後、細胞に取り込まれたトリチウムチミジンのカウントを液体シンチレーションカウンターにて測定した。

【0034】実施例1

①グリオーマ細胞NMC-G1の培養上清の採取

ヒトグリオーマ細胞NMC-G1を、10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地中でコーニングローラーボトルを用い回転させながら37℃で培養した(0.2回/分)。コーニングローラーボトル表面上にNMC-G1

細胞がコンフルエントの状態になった後、培地を0.5%ウシ胎児血清を含むD MEM培地に変更した。3~4日おきに細胞培養上清を採取し、培地を新しい0.5%ウシ胎児血清を含むD MEM培地に変更した。採取した細胞培養上清を遠心し(ベックマン社製、モデルJ-6B、4000回転/分、15分間)、遠心上清を得、精製の出発材料とした。

【0035】②GAFの精製

ステップ1：ヘパリンアフィニティカラムクロマトグラフィー

①に記した方法で得たNMC-G1細胞の培養上清18リットルに5M NaCl水溶液を1/50容量(360ml)、10%Na₃N₃を1/1000容量(18ml)添加した。このように調製したNMC-G1細胞培養上清を、あらかじめ0.2M NaClを含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.6)で平衡化したヘパリンセファロース(登録商標)CL-6Bカラム(ベッド容積は5.8ml)に通した(25ml/時間、4℃)。カラムを80mlの0.3M NaCl、0.1%CHAPSと15%グリセリンを含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.6)で洗浄した後(25ml/時間、4℃)、吸着したたんぱく質をNaClの濃度を直線的に上昇させることにより溶出し、分画した。塩濃度勾配は0.3M NaCl、0.1%CHAPSと15%グリセリンを含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.6)50mlに、1.2M NaCl、0.1%CHAPSと15%グリセリンを含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.6)50mlを加えていくことにより作製した(25ml/時間、2ml/フラクション、4℃)(図3)。

【0036】ステップ2：濃縮

合計3.2リットルの培養上清についてステップ1のヘパリンアフィニティカラムクロマトグラフィー(ステップ1)を行ない活性画分をプールした(19.2ml)。この溶液をDiaflow YM-10メンブレン(分画分子量:10,000、Amicon Corp社製、Massachusetts, U.S.A.)で窒素ガス加圧下約3.5mlにまで濃縮した(4℃)。

【0037】

ステップ3：ゲルろ過カラムクロマトグラフィー
ステップ2で濃縮した溶液約3.5mlをセファクリルS-200HR(ベッド容積は17.87ml、内径5cm×長さ9.1cm、Pharmacia LKB Biotechnology)にのせ、0.5M NaClと0.1%CHAPSを含む20mMトリス塩酸緩衝液で溶出・分画した(8.5ml/時間、10ml/フラクション、4℃)(図2)。各分画についてグリア細胞に対する増殖促進活性を参考例1に記載の方法で測定し、活性を示した画分(フラクション105からフラクション117)をプールした。さらに5.5リットルのNMC-G1培養上清について、ステップ1、2、3の各ステップを2回に分けて行なった。

【0038】ステップ4：ヘパリンアフィニティカラ

ムクロマトグラフィー

3回のゲルろ過カラムクロマトグラフィーでの活性画分をプールした(39.0ml)。プールした溶液に9.9mlの10.0%グリセリン、2.61mlの10%CHAPS水溶液、5.22mlの1Mトリス塩酸緩衝液(pH7.6)と15.4mlの水を添加した(合計65.1ml)。これをあらかじめ0.3M NaCl、0.1%CHAPSと15%グリセリンを含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.6)で平衡化したヘパリンセファロース(登録商標)CL-6Bカラム(ベッド容積は5.8ml)に通した(25ml/時間、4℃)。カラムを80mlの0.3M NaCl、0.1%CHAPSと15%グリセリンを含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.6)で洗浄した後(25ml/時間、4℃)、吸着したたんぱく質をNaClの濃度を直線的に上昇させることにより溶出し、分画した。塩濃度勾配は0.3M NaCl、0.1%CHAPSと15%グリセリンを含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.6)50mlに、1.2M NaCl、0.1%CHAPSと15%グリセリンを含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.6)50mlを加えていくことにより作製した(25ml/時間、2ml/フラクション、4℃)(図3)。

【0039】ステップ5：ヘパリンアフィニティー高速液体カラムクロマトグラフィー

ステップ4でのグリア細胞に対して増殖促進作用を示す活性画分(フラクションNo.23-30)をプールした1.6mlに、3.2mlの0.1%CHAPSと15%グリセリンを含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.6)を添加した。この4.8mlの溶液のうち4.6mlを、HR-894カラム(径8mm×長さ50mm、昭和電工、日本)を装置した高速液体クロマトグラフィー(Varian model 5040 system、Varian Associates社製、California, U.S.A.)にかけた。レジンに吸着したたんぱく質は、NaClの濃度を直線的に上昇させることにより、流速1ml/分で溶出し、分画(1ml/フラクション)した。用いた緩衝液はAが0.2M NaCl、0.1%CHAPSと15%グリセリンを含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.6)で、Bが2M NaCl、0.1%CHAPSと15%グリセリンを含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.6)である。溶出のプログラムは次に記すとおりで行なった。すなわち0分(100%A)-10分(90%A+10%B)-15分(90%A+10%B)-50分(65%A+35%B)-60分(100%B)-64分(100%B)-65分(100%A)として行なった(図4)。カラム温度は室温であった。

【0040】

ステップ6：逆相高速液体カラムクロマトグラフィー

ステップ5で得られた活性画分(フラクションNo.32-38)をプールした7mlに、1.75mlの0.5M

リン酸緩衝液 (pH 6.0) を添加した。この 8.75 ml の溶液のうちの 8 ml を、Vydac C4 カラム (径 0.46 cm × 長 25 cm, Vydac, California, U.S.A.) を装着した高速液体クロマトグラフィー (Varian model 5040 System) にかけた。吸着したたんぱく質はアセトニトリルの濃度を直線的に上昇させることにより流速 0.8 ml/分で溶出・分画 (0.8 ml/フラクション) した。用いた溶媒は A が 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) - 99.9% 水、B が 0.1% TFA - 90% アセトニトリルとした。溶出のプログラムは次に記すとおりで行なった。すなわち 0 分 (100%A) - 15 分 (65%A + 35%B) - 110 分 (50%A + 50%B) - 112 分 (100%B) - 117 分 (100%B) - 120 分 (100%A) として行なった (図 5)。カラム温度は室温であった。分取後、スピードバ

ックコンセントレーター (モデル A290、サーパント社製、米国) でアセトニトリルを除去した後、蒸留水を添加してすべての画分を 0.5 ml の液量に調製した。活性画分 (フラクション 55, 59, 60, 61, 62) を 2-メルカプトエタノール存在下 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、銀染色した結果を図 6 に示す。各画分は各々 25 kDa (フラクション 55)、29 kDa (フラクション 59, 60)、30 kDa (フラクション 61, 62) の単一なバンドを与えた。

【0041】③ 精製の要約

NMC-G1 培養上清 33 リットルを用いての精製の要約を表 1 に記す。

【0042】

【表 1】

サンプル	全たんぱく量 (mg)	全活性 (U)	比活性 (U/mg)	活性回収率 (%)	精製倍数
ヘパリン 2 モル 食塩溶出液	221	177×10^3	8.0×10^2	100	1
濃縮 (YM-10)	217	216×10^3	1.0×10^3	122	1.3
セファクリル S-200HR	17.3	126×10^3	7.3×10^3	71	9.1
ヘパリンカラム(2回目)	2.12	60.6×10^3	2.9×10^4	34	36
ヘパリン HPLC	0.453	34.5×10^3	7.6×10^4	20	95
逆相HPLC 分子量 25,000 0.0003*		1.84×10^3	6.1×10^6	1.1	7,600
分子量 29,000 0.0002*		1.26×10^3	6.3×10^6	0.7	7,900
分子量 30,000 0.0011*		4.85×10^3	4.4×10^6	2.8	5,500

【0043】生物活性の測定は、参考例 1 に記載した方法で行なった。生物活性の単位はトリチウムチミジンの 50% 取り込み値を示すサンプルの希釈率の逆数とした。なお、トリチウムチミジンの 100% 取り込み値は、10% ウシ胎児血清により誘導される値とした。蛋白質量は 280 nm における吸光度 1.0 が 1 mg/ml の蛋白濃度であるとして換算した。*印の蛋白質量は銀染色による標準蛋白の染色強度を基に決定した。

【0044】

実施例 2 GAF の各種培養細胞に対する作用 (1)

① グリア細胞に対する増殖促進活性

実施例 1-② に記載した方法で得られた精製本因子は、グリア細胞に対し増殖促進活性を有している (図 7)。図中横軸は GAF 濃度を示す。なおグリア細胞に対する

増殖促進活性の測定方法については、参考例 1 に記載した方法に従って行なった。精製の最終ステップである逆相高速液体カラムクロマトグラフィーおよびアセトニトリルを除去する操作をした直後の精製標品について、再度グリア細胞に対する増殖促進活性を測定した。その結果を図 8 に示す。図中横軸は GAF 濃度を示す。図 7 と図 8 の結果において、50% トリチウムチミジン取り込み値を与える GAF 濃度に差が生じたのは、以下の理由によると考えられる。すなわち、図 7 は精製後 -80°C で保存後の標品を用いた時の結果であり、低蛋白濃度溶液の凍結融解操作により GAF 蛋白が変性失活または容器へ吸着したものと推測される。

【0045】(2) グリア細胞増殖促進活性②

GAF を添加した後のグリア細胞数の変化を調べた。以

下に記載した方法に従って行った。非効化したウシ胎児血清を10%含むDMEM培地に 3×10^4 個/mlとなるように浮遊させ、その $500\mu l$ を24穴の培養プレート(Linbro社製、米国)の各ウェルに入れ、3日間培養した。その後各ウェルより $440\mu l$ の培地を廃棄し、新たに $340\mu l$ のDMEMを添加した。次に実施例1-②ステップ4に記載したヘパリンアフィニティカラムクロマトグラフィーで得られたGAF活性画分を、非効化したウシ胎児血清を1.25%含むDMEM培地で50倍に希釈した溶液を $50\mu l$ 、またヘパリンと同じ溶液で $500\mu g/ml$ となるように溶解した溶液 $50\mu l$ を添加したウェル、どちらか片方のみを添加したウェル、また対照群として両方を添加しないウェルを作った。全てのウェルは、非効化したウシ胎児血清を1.25%含むDMEM培地で最終容積が $500\mu l$ となるようにした後、さらに2日間培養した。培養後、各ウェルを $3ml$ のDMEMで2度洗浄し、 $0.5ml$ の0.2%トリプシンと0.01%EDTAを含むPBSを添加し細胞を浮遊させ、各ウェルの細胞数をコールター細胞数計測機(コールター社、ZM型)を用いて算定した。結果を図9に示す。グリア細胞数はGAFを添加することにより無添加群に比べ1.6倍に増加した。しかしヘパリンを添加したことによる効果はなかった。

【0046】(3) グリア細胞増殖促進活性の経時変化 GAFのグリア細胞増殖促進活性の経時変化を、以下に記すこと以外は参考例1に記載した方法に従って調べた。すなわち、実施例1-②のステップ5に記載したヘパリンアフィニティ高速液体カラムクロマトグラフィーで得られたGAF活性画分を、非効化したウシ胎児血清を1.25%含むDMEM培地で800倍に希釈したサンプル $20\mu l$ をウェルに添加後、4.8, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31および40時間後に、各ウェルにそれぞれ $1\mu Ci$ のトリチウムチミジンを添加した。3時間後にハーベストし、細胞を取り込まれたトリチウムチミジンのカウントを液体シンチレーションカウンターにて測定した。結果を図10に示すが、GAF添加後16から19時間後にトリチウムチミジンの取り込みがピークになった。

【0047】(4) 線維芽細胞に対する増殖促進活性 実施例1-②に記載した方法で得られた精製本因子は、線維芽細胞マウスBALB/3T3clone A31細胞に対し増殖促進活性を有していた(図11)。図中横軸はGAF濃度を示す。なお線維芽細胞A31に対する増殖促進活性の測定については、以下に記載する方法で行なった。マウスBALB/3T3clone A31細胞を5%仔牛血清を含むDMEM培地でヌンク96穴マイクロタイタープレート(平底)に1穴あたり 2×10^3 個を $75\mu l$ の培地にて播種して、培養し、翌日、各ウェルより $50\mu l$ の培地を廃棄し、各ウェルに血清を含まないDMEM培地を $175\mu l$ 添加した。3~4日間

培養したのち各ウェルより $20\mu l$ の培地を廃棄した。その後、非効化したウシ胎児血清を1.25%含むDMEM培地で適当に希釈したテストサンプルの $20\mu l$ を各ウェルに添加後一晩培養した。翌朝、各ウェルに $1\mu Ci$ のトリチウムチミジン($5Ci/mmole$ 、 $1mCi/ml$ RCC Amersham)を添加後、さらに5~7時間培養した。培養後各ウェルを約 $1ml$ のPBSで洗浄し、 $100\mu l$ の5%SDS水溶液を添加し、37℃で一晩放置した。各ウェルの細胞抽出液をチューブに集め、細胞に取り込まれた 3H -Tdr量をシンチレーションカウンターにて測定した。さらに、精製の最終ステップである逆相高速液体カラムクロマトグラフィーおよびアセトニトリルを除去する操作をした直後の精製標品について、 $5Ci/mmole$ 、 $1mCi/ml$ のトリチウムチミジン溶液を用いて再度線維芽細胞A31に対する増殖促進活性を測定した。その結果を図12に示す。図中横軸はGAF濃度を示す。図11と図12の結果において、50%トリチウムチミジン取り込み値を与えるGAF濃度に差が生じたのは、以下の理由によると考えられる。すなわち、図11は精製後-80℃で保存後の標品を用いた時の結果であり、低蛋白濃度溶液の凍結融解操作によりGAF蛋白が変性失活または容器へ吸着したものと推測される。

【0048】

(5) ヒトさい帯血管内皮細胞に対する作用

実施例1-②に記載した方法で得られた精製本因子は、ヒトさい帯血管内皮細胞に対し増殖促進活性を有していないかった(図13)。図中横軸はGAFまたはbFGFのたん白濃度を示す。なおヒトさい帯血管内皮細胞に対する増殖促進活性は以下に記載する方法に従って行なった。本検定に用いられた細胞は、ヒトさい帯より単離された静脈血管内皮細胞(以下HUVE細胞)である。また、細胞増殖度の測定には以下に述べるMTTアッセイ法を用いた。MTTアッセイの手法は多田らの方法[ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッド(J. Immunol. Methods), 93, 157 (1986)]に若干の変更を加えた。即ち、継代維持されているHUVE細胞を0.002%EDTA(ドータイト社345-01882)を含む0.125%トリプシン酵素溶液(ベーリングガーマンハイム社)を用いて単一細胞に解離し、得られた細胞を牛胎児血清(ウイタカーバイオプロダクト社)を2.5%含む、GIT培地(日本製薬398-00515)からなるHUVE細胞培地に懸濁した。この細胞懸濁液に含まれる細胞数をコールター細胞数計測機(コールター社 ZM型)を用いて算出し、以下の培養に供した。 2×10^3 個のHUVE細胞を含む $100\mu l$ のHUVE細胞懸濁液を、96穴培養皿(ヌンク社 F96)に加え、37℃で培養した(日立炭酸ガス-窒素ガス制御培養機CH-16型、CO₂:5%、O₂:7%)。培養翌日に、各々のサンプルをHUVE細胞培地に加えた。さらにヘパリン(シグマ社)を終濃度 $5.0\mu g/ml$ ないし $20\mu g/ml$ に

なるように添加したものである。各サンプルを加えたのち、さらに培養を3日間行ない、培養皿より培地を除き、1.0 mg/mlのMTT試薬（ドータイト社 34101823）を含むHUVE培地を100 μl加え、37℃で4時間保温した。その後、10% SDS水溶液（和光純薬 191-07145）を100 μl加え、4時間保温を続けた。反応終了の後、反応液を含む96穴培養皿を振盪し、反応液の波長590 nmにおける吸収を、マイクロタイタープレート吸光度測定機（タイターテック MCC 341）を用いて測定した。

【0049】(6) ラット副腎褐色細胞腫由来PC-12細胞株に対する作用

実施例1-②に記載した方法で得られた精製本因子は、ラット副腎褐色細胞腫由来PC-12細胞株に対し増殖促進活性を有していた（図14）。図中横軸はGAF濃度を示す。なおPC-12に対する増殖促進活性の測定は以下に記載する方法で行った。GAFを非効化したウマ血清を1%含む RPMI-1640培地で適当に希釈し、その50 μlを96穴マイクロプレートに入れ。次にPC-12細胞を非効化したウマ血清を1%含むRPMI-1640培地に10⁶個/mlになるよう浮遊させ、その細胞浮遊液50 μlを96穴の平底マイクロプレート（A/N Nun c社製、Roskilde、デンマーク）の各ウェルに入れ、さらに2日間培養した。培養後、各ウェルに0.5 μCiのトリチウムチミジン（5 Ci/mmol、1 mCi/ml RCC Amersham）を添加後、さらに5時間培養した。培養後細胞をTiter tekセルハーベスターを用いてガラスファイバーフィルター上に集め水で洗浄後、細胞に取り込まれた³H-チミジンのカウントを液体シンチレーションカウンターにて測定した。

【0050】(7) 活性の安定性

ヘパリンセファロース（登録商標）CL-6Bの2M NaCl溶出画分（実施例1②ステップ1）を、100℃で5分熱処理すると活性は完全になくなかった。また室温でpH 2、30分処理すると部分的に活性を失った（図15）。図中横軸はGAFの希釈倍数を示している。

(8) 抗原性：酸性線維芽細胞増殖因子（aFGF）塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）とグリア活性化因子間の免疫学的交差性

実施例1-②に記載の方法により精製した標品について、抗aFGFウサギポリクローナル抗血清と抗bFGFウサギIgGを用いてウエスタンプロットを行なった（図16）。図16から判るように本因子はaFGFとbFGFそれぞれとの間に免疫学的交差性を示さなかった。

【0051】実施例3

NMC-G1細胞が産生するGAF蛋白成分の性質

実施例1で得られた25 kDa GAF 30 μg、29

kDa GAF 30 μgおよび30 kDa GAF 60 μgをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動した後、ProBlottメンブレン（Applied Biosystem社製、カリフォルニア、米国）上に乾式プロッティング装置（ATTO社製、東京）を用いて蛋白をトランスファーした。メンブレンを2% PVP-360溶液（2% ポリビニルピロリゾン-360）（シグマ社製、米国）を含むリン酸緩衝液-食塩（8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.15 g Na₂HPO₄, 0.2 g KH₂PO₄を1リットルの水に溶かし pH 7.4としたもの）に45分間振とうしつつ浸した後、メンブレンをビオチニル化コンカナバリンA（Vector Lab社製、米国）を10 μg/mlの濃度で含む2% PVP-360溶液に移し、1時間振とうした。その後メンブレンをTNT緩衝液（0.5 M NaClと0.1% Triton X-100を含む25 mMトリス塩緩衝液（pH 7.5））で洗浄した（10分間、3回）。さらに、メンブレンをアビディンとビオチニル化西洋ワサビペルオキシダーゼ複合物（Standard Vectastain（登録商標）ABCキット、VectorLab社製）を含むリン酸緩衝液-食塩溶液に45分間振とうしつつ浸した後、TNT緩衝液で洗浄した（10分間、3回）。12 mg 4-クロロ-1-ナフトールと4 mlメタノールを混ぜたものに20 ml TNT緩衝液（0.5 M NaClを含む25 mMトリス塩緩衝液（pH 7.5））と13.2 μl過酸化水素水を混ぜたものを加え、それにメンブレンを浸し、発色させた。図17にその結果を示す。N-グリカナーゼを用いる酵素的脱グリコシル化は、Genzyme社（ボストン、米国）のプロトコールに従って実施した。GAFをN-グリカナーゼ処理した後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、ゲルを銀染色した結果を図18に示す。25 kDa、29 kDa および30 kDa のGAFは部分的ではあるが、各々その分子量が3から4 kDaだけ減少した。以上、二つの実験より、25 kDa、29 kDa および30 kDa GAFにN-グリコシド型糖鎖が付加していることが確認された。

【0052】実施例4

N末端アミノ酸配列の分析

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（還元条件下）で単一な3種類のGAF（25 kDa、29 kDa および30 kDa）を、ポリビニリデンダイフルオライドタイプのメンブレンであるProBlott（登録商標）（Applied Biosystems社製、カリフォルニア、米国）に吸着させ、プロテインシークエンサー（モデル473Aシステム、Applied Biosystems社製）を用いて、アミノ酸配列の解析を行なった。用いた蛋白量は、25 kDa GAFが60 pmol、29 kDa GAFが5 pmol、30 kDa GAFが55 pmolであった。得られた配列の結果を以下に記す。

1 5 10 15 16
25 k Da Ala-Asp-Z₁-Leu-Gly-Gln-Ser-Glu-Ala-Gly-Gly-Leu-Pro-X-Gly-Pro-
 20 21
Ala-Val-Thr-Asp-Leu- (配列番号: 3)
 1 5 6 7 10 13
29 k Da X-Gln-Asp-Ala-Val-Pro-Phe-Gly-Asn-Val-Pro-(Ser)-Leu- (配列番
 号: 4)
 1 5 10 15 16
30 k Da Z₂-Gly-Glu-Val-Gly-Asn-Tyr-Phe-Gly-Val-Gln-Asp-Ala-Val-Pro-Phe
 20 23
-Gly-Asn-Val-(Pro)-X-Leu-Leu- (配列番号: 5)

Z₁=H i s または P r o を示す。

Z₂=L e u または A l a を示す。

X: 未同定のアミノ酸

(): 確定できなかったが推定されたアミノ酸

最初のステップのアミノ酸 (N末端アミノ酸) および1
0番目を超えるアミノ酸については確実性に乏しい。

【0053】実施例5

G A F c D N A のクローニングとその塩基配列の解析
実施例3で得られた30 k Da G A Fのアミノ酸配列を
もとに、この配列に対応し、かつ制限酵素の認識配列を
附加した下記のオリゴヌクレオチドプライマー2本 (p
r i m e r 1, 2) を合成した。

1 5 10
30 k Da GAF Z₂ Gly Glu Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val-
primer 1: 5' -AAGGATCCGTIGGIAAYTAYTTYGG-3' (配列番号: 6)
 11 15 20 23
Gln Asp Ala Val Pro Phe Gly Asn Val(Pro) X Leu Leu
Primer2: 5' -AAGAACACRTTICRAAIGGIAC-3' (配列番号: 7)

Z₂=Leu または A l a を示す。 I: Inosine Y=T/C, R=A/G

このプライマーを用いてヒトゲノム由来DNAをテンペ
レートとしてPCR (polymerase chain reaction) 反応 (Mullis, K, Bと
Fulloora, F. A. メソッズ イン エンザイモ
ロジイ (Academic press) 155巻、3
35頁、1987) を行った。(GeneAmp (登録
商標) DNA Amplification Reag
ent K't (シータス社、米国) ゲノムDNA 1 μ
gに対して、プライマー1, 2をそれぞれ560ng加
え、100 μlの反応液中Ampli Taq (登録商
標) (シータス社、米国) 2.5ユニットを添加して9
4°C 1分、50°C 2分、72°C 3分のDNA合成サイク
ルを25回くり返した。この反応物について、アクリル
アミドゲル電気泳動を行い予期される長さ (63 bp) の
断片を回収し、その塩基配列を解析したところ、下記の
配列が得られた。

5' -GGATCCGTGGGGAACTATTCG
GGGTGCAGGATGCGGTCCCCCTTCGG
CAACGTGAATTTC-3' (配列番号: 8)

この配列をもとに再度、下記のプローブ2本 (p
r o b e 1, 2) を化学合成した。

p r o b e 1 5' -TGGGGAACTATTCG
GGGTGCAGGATGCGG-3' (配列番号:
9)

p r o b e 2 5' -ACGTTGCCGAAGGGG
ACCGCATCCTGCACC-3' (配列番号: 1

0)
一方ヒト皮包由来初代培養細胞mRNAより合成したc
DNAをpCDベクター [Okayamaら、モレキュ
ラー・セル・バイオロジー (Molecular Ce
ll Biology), 3, 280 (1983) 参
照] に組み込んで作成した大腸菌x1776を宿主とし
たcDNAライブラリーをNational Institute of Child Health and
Human Development. Bethesda, U. S. A. の岡山博士より分与を受けた。このc
DNAライブラリーよりアルカリ法 (Birnboim
m. H. C. & Doly. J. ヌクレオツク・アシッ
ズ・リサーチ (Nucleic Acids Research), 1, 1513 (1979)] でプラスミD
NAを抽出し、このDNAを大腸菌DH1に感染させ、
約2×10⁵ 個のcloneよりなる大腸菌DH1を宿
主としたcDNAライブラリーを作成した。

【0054】上記大腸菌DH1を用いたcDNAライブ
ラリーをニトロセルロースフィルター (ミリポア社、H
ATFフィルター) 上に約1×10⁵ clone/フィ
ルターとなるように10枚まき、このフィルターをマス
ターフィルターとしている各2枚ずつを1組としたレブ
リカフィルター計20枚を作成した。このレブリカフィ
ルター上の大腸菌を0.5N NaOH溶液で溶かし、
露出変性したプラスミドDNAをフィルター上に固定し
た [Crunstein. M. & Hogness,

D. S., Proc Natl Acad Sci U S A 72, 8961 (1975)]。

【0055】前記化学合成したprobe 1, 2についてT4ポリヌクレオチドキナーゼと γ - 32 P ATPにより、5'末端に 32 Pを導入し、これらをプローブとして別々にDNAを固定したレプリカフィルターに会合させた。会合反応は、10 μ Ciのプローブを含む5×SSPE [180mM NaCl、10mM NaH₂PO₄、1mM EDTA (pH 7.4)]、5×Denhardt's, 0.1% SDS、100 μ g/ml変性サケ精子DNA溶液10ml中で、55°C 16時間行い、反応後フィルターを5×SSC [0.15M NaCl、0.015M Sodium citrate] 0.1% SDS溶液で室温で3回さらに60°C 30分ずつ2回洗浄した [T. maniatisら、"Molecular Cloning" Cold Spring Harbor Laboratory, P. 309 (1982)]。

【0056】洗浄したフィルターよりラジオオートグラムをとり、二種類のプローブの両方に対して反応する菌株を一組2枚のレプリカフィルターのラジオオートグラムを重ね合わせることにより探した。この方法により1×10⁶クローニングより二種類のプローブに対して反応する2株を得た。これら2株よりプラスミドDNAをアルカリ法(前出)によって抽出精製した。プラスミドDNA中のcDNA部分を制限酵素BamHIにより切り出し、アガロースゲル電気泳動で分画すると、2株由来のcDNAはいずれも約1.55Kbの同鎖長を示した。従って、この2株は同じものであると考えられた。この2株の一方の菌株(Escherichia coli DH-1/pGAF1)に含まれるプラスミド中のcDNA部分の塩基配列をジデオキシヌクレオチド合成鎖停止法(J. Messingら、ヌクレイック・アシックス・リサーチ, 9, 309 (1981))によって決定した。その塩基配列(配列番号: 2)および塩基配列から推定されるアミノ酸配列(配列番号: 1)を図19に示した。pGAF1に含まれるcDNA部分は1493bpであり、5'側非翻訳領域、全アミノ酸コード領域、3'側非翻訳領域及びpolyA鎖を含んでいた。コードされていたアミノ酸配列は208アミノ酸であり、この配列中にN末端配列分析(実施例4)により明らかにされた30kDa、29kDa、25kDaの部分アミノ酸配列はすべて含まれていた。一部(25kDaの1位のAla、29kDaの12位のSer、30kDaの23位のLeu)、蛋白のアミノ酸分析(実施例4)で得られた配列と相異するアミノ酸配列がコードされているが、相異点はいずれもアミノ酸配列分析で不確実な結果を与えやすいN末端、あるいは10残基を超えて同定された部分であり、cDNAより推定された配列の方が正しいものと考えられる。

【0057】実施例6 GAFをコードする遺伝子の動物細胞における発現:

(1) GAFのCOS-7細胞での発現
サルCOS-7細胞を10%NU-Serum (Collaborative Research社)を含むIMDM培地でファルコン径60mmプラスチックディッシュに1枚当り 6×10^5 個播種した。翌日無血清のIMDM培地で洗浄後、公知の方法[B. Seedら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 52: 3365 (1987)]に従い、プラスミドpGAF1のDNA 2 μ g及び10 μ gと400 μ g/mlのDEAE-dextranとを含む反応溶液を調製し細胞に添加した。37°Cで4時間インキュベーションした後に2分間DMSO処理を行った。その後10%NU-Serumを含む培地(3ml/ディッシュ)で培養を続け、70~72時間後に產生されたGAFを含む培地を集めた。さらにディッシュあたり1.5mlのリン酸緩衝生理食液水中に細胞を回収した。pGAF1をトランスフェクトしたCOS-7細胞の培養上清中にグリア細胞増殖促進活性が検出された。GAF cDNAが含まれていないベクターだけのプラスミドpCDXをトランスフェクトしたCOS-7細胞、またトランスフェクトしない細胞の培養上清中には活性は検出されなかった(図20)。凍結融解を2度および超音波処理をして得られた細胞抽出液中にはコントロールと比べて有意な活性がなかった。この結果からpGAF1のcDNAがGAFをコードしていることが確認されるとともに、COS細胞でcDNAを発現させると産物は培養液中へ分泌されることが明らかとなった。

【0058】(2) GAFのCHO細胞での発現

(a) 発現用プラスミドpDGAF1の構築
前記実施例5で得られたGAFの全構造を含むプラスミドpGAF1を制限酵素BamHIで切断し、1.55kbのDNA断片を単離した。一方、動物細胞用ベクターpTB399 [セル・ストラクチャー・アンド・ファンクション(Cell Struct. Funct. 12: 205 (1987))]を制限酵素BamHIで切断しIL-2 cDNA領域を除去した後、前記のGAF cDNA 1.55kb断片を挿入して、Abelson マウス白血病ウイルス(MuLV)LTRの支配下に動物細胞でGAF cDNAを発現させ得る発現用プラスミドpRGB12を構築した。さらに、これを制限酵素SalI-HindIIIで切断して発現ユニット部分(プロモーター-遺伝子-ポリ(A)シグナル)をハムスタージヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)発現用プラスミドpTB348 [セル・ストラクチャー・アンド・ファンクション(Cell Struct. Funct. 12: 205 (1987))]のSV40プロモーター上流にあるSalI-HindIII部位に挿入して、プラスミドpDGAF1を構築した。プラスミドpDGAF1の構築図を図21に示す。

【0059】(b) CHO細胞における発現

CHO d h f r + 細胞を 10% 牛胎児血清を含む Ham F12 培地で直径 6 cm の組織培養用ディッシュに播種し、翌日、同培地で培地交換した。2 時間後にリン酸カルシウム法 (Graham ら、Virology) 52, 456 (1973) によりプラスミド pDGA F1 DNA 1.0 μg をトランسفェクトした。2 日間、増殖培地で培養した後、細胞を 3.5 μg/m1 プロリンと 10% 透析 FCS を含む DMEM 培地で 9.6 穴マイクロプレート (Nunc 社) にまき直し、3~4 日毎の培地交換を行い、いくつかの d h f r + 形質転換体を選択した。これらを 3.5 μg/m1 プロリンと 5% FCS を含む DMEM 培地で 2.4 穴マイクロプレート (Linbro, Flow 社) に移し、各クローンを培養した。以後、用いた培地は 3.5 μg/m1 プロリンと 5% FCS を含む DMEM 培地である。これらのクローンのうち GAF たん白を産生している 1.6 クローンを 6 cm の組織培養用ディッシュに移し、メトトレキセート (MTX) 濃度を 3 段階 (0, 1, 1, 10 μM) に上げながら、10 μM MTX 耐性株を取得し GAF 遺伝子の増幅をはかる。各クローンの培養上清中に含まれる GAF 活性を図 2.2 に示す。図中、横軸は添加した培養上清の希釈率を示している。GAF 活性の高いクローンを選択し、糖鎖の付加した天然型 GAF 産生細胞として確立し、GAF の採取等に用いる。

【0060】実施例 7 GAF 遺伝子導入によるマウス

表 2 GAF 遺伝子導入による A31 細胞のフォーカス形成

プラスミド	トランسفェクトしたDNA量 (μg)				
	0	1	2	5	10
pTB1055	0*	N. T.	0	N. T.	0
pRGB12	0	3	28	25	33

* : ディッシュ当たりのフォーカス数

N. T. : 未検討

実施例 8

(1) GAF の大腸菌での発現

(a) GAF 発現用プラスミド pETGAF1 の構築
前記実施例 5 で得られた GAF の全構造遺伝子を含むプラスミド pGAF1 を制限酵素 KpnI-BamHI で切断し、1.25 kb の cDNA 断片を単離した。一方、T7 プロモーターを含むプラスミド pET3-c を制限酵素 NdeI-BamHI で切断し、4.6 kb の DNA を単離し、そこに前記の GAF cDNA 1.25 kb 断片と、精製 GAF タンパク N 末端の Leu の前に Met が来る様に合成した DNA 断片 (NdeI-KpnI) ([配列番号 11] および [配列番号 12]) を挿入して、T7 プロモーターの支配下に、GAF cDNA を発現させ得る発現用プラスミド pETGAF1 を構築した。プラスミド pETGAF1 の構築図を図 2.3 に示す。このプラスミドを用いて大腸菌 MM294

BALB/c 3T3 細胞の形質転換

(1) GAF 発現用プラスミド pRGB12 の構築

実施例 6 に記載したプラスミド pRGB12 を GAF 発現用プラスミドとした。コントロールのプラスミドとしては、GAF cDNA インサートのないプラスミド pTB1055 を用いた。

(2) BALB/c 3T3 細胞の形質転換

マウス BALB/c 3T3 clone A31 (サブクローニング A31-1-1 (Kakunaga ら、サイエンス (Science) 209, 505 (1980))、Dr. K. Kakunaga より分与を受けた) を 10% 牛血清を含む DMEM 培地で直径 6 cm の組織培養用ディッシュに 1×10^5 個播種し、翌日、同培地で培地交換した。3 時間後にリン酸カルシウム法 (Graham ら、Virology) 52, 456 (1973) によりプラスミド pRGB12 あるいは pTB1055 を 1, 2, 5 および 10 μg、それぞれトランسفェクトした。37°C で 4 時間インキュベートした後、1.5% グリセロールを含む PBS 液で 3 分間刺激した。5% 牛血清を含む DMEM 培地で 3~4 日毎に半量ずつ培地交換を行いながら 4 週間培養を続けた。培養終了後、培地を捨て、氷冷メタノールを加え 15 分間細胞を固定した。水洗後、ギムザ液で 20 分間染色した。ディッシュを水洗、風乾後、染色されたフォーカスを数えた。その結果を表 2 に示す。GAF 遺伝子には、はつきりとした形質転換性があることがわかった。

【0061】

(DE3) / pLysS を形質転換することにより、GAF を発現する形質転換体 E. coli MM294 (DE3) / pLysS, pETGAF1 を得た。得られた MM294 (DE3) / pLysS, pETGAF1 を LB 培地で培養し、イソプロピル-β-D-チオガラクトシド (和光純薬 (株)、日本) で発現を誘導した後、培養液 200 μl 相当の菌体全抽出蛋白質を GAF 蛋白の N 末端部分を認識するウサギ抗 GAF ポリクローナル抗体 (×500 倍希釈) を用いウエスタンプロテイング法により調べると、特異的なバンドが確認された (図 2.4)。GAF cDNA の含まれないプラスミド pET3-c による形質転換体 MM294 (DE3) / pLysS, pET3-c ではこのバンドは産生されない。

【0062】(2) 大腸菌で產生させたヒト GAF (rhGAF) の抽出

E. coli MM294 (DE3) / pLysS, pETGAF1 を 50 μg/m1 のアンピシリンおよび 10

$\mu\text{g}/\text{ml}$ のクロラムフェニコールを含む LB メディウム中にて 37°C で振とう培養した。培養液の Klett 値が 120 に達した時点でイソプロピル- β -D (-) チオガラクトシドを最終濃度 0.4 mM になるように添加し、さらに 37°C にて 3.5 時間振とう培養した。1 リットルの培養液より、遠心 (6,000 回転/分、10 分間) により集めた菌体を、氷上にて、80 ml の 2 mM (p-アミジノフェニル) メタンスルホニルフルオライド ハイドロフルオライド (和光純薬 (株)、日本)、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の卵白リゾチーム (生化学工業株式会社、東京)、および 0.1 M 食塩を含む 20 mM トリス塩酸緩衝液で懸濁させ 4°C にて 1 時間置いた後、37°C で 3 分間インキュベートした。その懸濁液を、氷で冷却して超音波処理 (BRANSON 社製、SONIFIER (登録商標)、米国、CELL DISRUPTOR 200 出力 8 にて 2 分間) した。大腸菌抽出物を 17,000 回転/分、40 分間の遠心により得た。

【0063】(3) 大腸菌が產生するヒトGAF (r h GAF) の精製

ステップ 1 : 硫安沈殿

1 リットルの培養液より得られた 80 ml の大腸菌抽出物に 27 ml の飽和硫酸アンモニウム水溶液を添加混合後、4°C にて 1 昼夜放置した。その後 17000 回転/分、40 分間の遠心にて上清を得た。

ステップ 2 : 疎水カラムクロマトグラフィー

ステップ 1 で得られた 100 ml の遠心上清を、あらかじめ 25% 鮑和硫酸を含む 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) で平衡化した Butyl-Toyopearl 650 M (ベッド容積 50 ml、内径 2.5 cm × 長さ 10 cm、東ソー株式会社製、東京) に通した (80 ml/時間、4°C)。12.5% 鮑和硫酸と 2 mM a PMSF を含む 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) で充分 坯体を洗浄後、15% グリセリン、0.1% CHAPS および 2 mM a PMSF を含む 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) で r h GAF 蛋白を含む画分を得た。

(80 ml/時間、10 ml/フラクション、4°C)

(図 25)。

ステップ 3 : ヘパリンアフィニティー高速液体カラムクロマトグラフィー

ステップ 2 での r h GAF 蛋白を含む画分 (フラクション 44 から 47) をプールした (40 ml)。この 40 ml の溶液のうち 36 ml を、HR-894 (内径 8 mm × 長さ 50 mm、昭和電工、日本) を装置した高速液体クロマトグラフィー (Gilson Medical Electronics 社製、フランス) にかけた。レジンに吸着したたんぱく質は、NaCl の濃度を直線的に上昇させることにより、流速 2 ml/分で溶出し分画 (2 ml/フラクション) した。用いた緩衝液は A が 0.4 M NaCl、0.1% CHAPS と 15% グリセリンを含む 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) で、B が 2 M NaCl、0.1% CHAPS と 15% グリセリンを含む 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) である。溶出のプログラムは次に記すとおりで行った。すなわち 0 分 (100% A) - 70 分 (75% A + 25% B) - 75 分 (100% B) - 80 分 (100% B) - 85 分 (100% A) として行った (図 26)。カラム温度は室温であった。

【0064】蛋白の溶出画分の 1 μl を 2-メルカプトエタノール存在下で SDS-ポリアクリルアミド電気泳動し (ゲル濃度 12.5%)、銀染色した結果を図 27 に示す。食塩濃度を上昇させることにより溶出されてきた画分は、27 kDa の単一なバンドを与えた。またこの 27 kDa たん白は N 末端部分と結合するウサギ抗 GAF ポリクローナル抗血清で認識された。(図 28)。フラクション 27 から 42 をプールした。

【0065】(4) 精製の要約

1 リットルの E. coli MM294 (DE3) / pLysS, pETGAF1 培養液から出発した r h GAF の精製の要約を表 3 に記す。

表 3

サンプル	全たん白量 (mg)	全活性 (U)	比活性 (U/mg)	活性回収率 (%)	精製倍数	
					回収率	倍数
大腸菌抽出物	672	4.16×10^7	6.19×10^4	100		1
25% 鮑和硫酸上清	210	4.35×10^7	2.07×10^5	105		3.3
Butyl-Toyopearl	37.6	4.10×10^6	1.09×10^5	10		1.8
ヘパリン HPLC	4.5	3.31×10^6	7.35×10^5	8.0		12

生物活性は、参考例 1 に記載した方法で行った。生物活性の単位はトリチウムチミジンの 50% 取り込み値を示すサンプルの希釈率の逆数とした。なお、トリチウムチミジンの 100% 取り込み値は、10% ウシ胎児血清により誘導される値とした。蛋白質量は MicroBCA キット (PIERCE 社製、米国) により、ウシ血清アルブミンを対照にして算定した。

【0066】

実施例 9 因子の各種培養細胞に対する作用 (2)

(1) グリア細胞に対する増殖促進活性

実施例 8-(3) に記載した方法で得られた r h GAF は、グリア細胞に対し増殖促進活性を有している (図 29)。図中横軸は GAF 濃度を示す。なおグリア細胞に対する増殖促進活性の測定方法については、参考例 1 に

記載した方法に従って行った。

(2) 線維芽細胞に対する増殖促進活性

実施例 8-(3) に記載した方法で得られた r h G A F は、線維芽細胞マウス BALB/c 3T3 clone A 3 1 細胞に対し増殖促進活性を有していた(図 30)。図中横軸は G A F 濃度を示す。なお線維芽細胞 A 3 1 に対する増殖促進活性の測定については、実施例 2-(4) で記載した方法に従って行った。

(3) ラット血管平滑筋細胞に対する増殖促進活性

実施例 8-(3) に記載した方法で得られた r h G A F は、ラット血管平滑筋細胞に対し増殖促進活性を有していた(図 31)。図中横軸は G A F 濃度を示す。なおラット血管平滑筋細胞に対する増殖促進活性の測定については、以下に記載する方法を行った。ラット初代培養血管平滑筋細胞を 10% 仔牛血清を含むイーグル MEM 培地でヌンク 96 穴マイクロタイタープレート(平底)に 1 穴あたり 3×10^3 個を $100 \mu l$ の培地にて播種して培養し、翌日、各ウェルより $80 \mu l$ の培地を廃棄し各ウェルに血清を含まないイーグル MEM 培地を $180 \mu l$ 添加した。2 日間培養したのち各ウェルより $20 \mu l$ の培地を廃棄した。その後、0.1% ウシ血清アルブミンを含む DMEM 培地で適当に希釈したテストサンプルの $20 \mu l$ を各ウェルに添加後一晩培養した。翌朝、各ウェルに $1 \mu Ci$ のトリチウムチミジン ($5 Ci/mmol$ 、 $1mCi/ml$ RCC Amersham) を添加後、さらに 5 時間培養した。培養後、各ウェルの培地を廃棄後、各ウェルに $100 \mu l$ の 0.5 トリプシンと 0.01% EDTA を含む PBS を添加し、数分の間室温にて放置した。顕微鏡で細胞が浮遊していることを確認した後、浮遊細胞をタイターテックセルハーベスター(Flow laboratones社製、Virginia, USA)を用いてガラスファイバーフィルター(大日本製薬株式会社製)上に集め水で洗浄後、細胞に取り込まれたトリチウムチミジンのカウントを液体シンチレーションカウンターにて測定した。

【0067】

(4) ヒトさい帯血管内皮細胞に対する作用

実施例 8-(3) に記載した方法で得られた r h G A F は、ヒトさい帯血管内皮細胞に対して増殖促進活性を有していないかった(図 32)。図中横軸は G A F または bFGF のたん白濃度を示す。なおヒトさい帯血管内皮細胞に対する増殖促進活性の測定については、実施例 2-(5) に記載した方法に従って行った。

【0068】

(5) r h G A F の巨核球系コロニー刺激因子活性

BALB/c メスマウス骨髄細胞は、20% ウシ胎児血清(FCS) 含有イスコフ改変ダルベッコ培地(1 MD M) に 2×10^7 個/ $m l$ となるように懸濁し、FCS をコートしたプラスチック培養皿中で 37°C、1 時間イ

配列:

ンキュベーションして付着性細胞を除去した。得られた非付着性骨髄細胞は、IMDM で 3 回洗浄した後実験に供した。細胞を 1% NeutridomaSP (boehringer mannheim 社) 含有 IMDM に懸濁し、ヒトリコンビナント G A F (r h G A F) とともに 1×10^5 個ずつ 96 穴平底プレートに播種した。r h G A F は 0.6 M NaCl, 1.5% グリセリン, 0.1% CHAPS, 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) に $125 \mu g/ml$ 溶解したものを IMDM で希釈して使用し、G A F を含まない緩衝液も同様に希釈して実験系に添加した。また、ポジティブコントロールとしてマウスリコンビナント IL-3 (murIL-3) (Genzyme 社) を用いた。これを、37°C、5% CO₂ を含む空気の存在下で 4 日間培養した。その後、5 mg/ml MTT (SIGMA 社) 含有 PBS 溶液を $20 \mu l$ 添加し、37°C で 5 時間培養した。10% SDS, 0.01 N HCl 溶液を $100 \mu l$ 添加し、37°C でさらに 1 晩インキュベートした後、590 nm の吸光度を測定し、骨髄細胞の増殖を調べ、図 33 に示した。一方、同様に調製した細胞を 37°C、5% CO₂ を含む空気の存在下で 7 日間培養した。5% グルタルアルデヒド含有 PBS 溶液を $50 \mu l$ 添加して 2000 rpm で 5 分間遠心し、細胞を固定した。0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) で一度洗浄後、アセチルコリンエステラーゼ染色(統生化学実験講座 8 血液上巻、149 頁参照)にて巨核球を染色し、ウェルあたりの巨核球数を倒立顕微鏡下で数え、図 34 に示した。これらの結果から、r h G A F にはマウス骨髄細胞を増殖させる活性があること、さらに骨髄細胞中の巨核芽球に作用してこの細胞を増殖分化させる活性があることが明らかとなった。

【0069】

【0070】

【配列表】

配列番号(SEQ ID NO): 1

配列の長さ(SEQUENCE LENGTH): 208

配列の型(SEQUENCE TYPE): アミノ酸 (amino acid)

トポロジー(TOPOLOGY): 直鎖状 (linear)

配列の種類(MOLECULE TYPE): タンパク質 (protein)

ハイポセティカル配列(HIPOTHETICAL): No

起源(ORIGINAL SOURCE)

生物名(ORGANISM): Homo sapiens

ハプロタイプ(HAPLO TYPE): 2n

組織の種類(TISSUE TYPE): skin

細胞の種類(CELL TYPE): fibroblast

直接起源(IMMEDIATE SOURCE):

ライブラリーナー(LIBRARY): Human foreskin cDNA library

クローン名(CLONE): pGAF1

Met Ala Pro Leu Gly Glu Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala
 5 10 15
 Val Pro Phe Gly Asn Val Pro Val Leu Pro Val Asp Ser Pro Val Leu
 20 25 30
 Leu Ser Asp His Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly Gly Leu Pro Arg Gly
 35 40 45
 Pro Ala Val Thr Asp Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg
 50 55 60
 Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly
 65 70 75 80
 Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu
 85 90 95
 Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser
 100 105 110
 Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu
 115 120 125
 Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp
 130 135 140
 Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg
 145 150 155 160
 Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr
 165 170 175
 Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val
 180 185 190
 Asp Pro Asp Lys Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Ile Leu Ser Gln Ser
 195 200 205。

【0071】配列番号(SEQ ID NO) : 2

生物名(ORGANISM) : Homo sapiens

配列の長さ(SEQUENCE LENGTH) : 1493

ハプロタイプ(HAPLO TYPE) : 2n

配列の型(SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

組織の種類(TISSUE TYPE) : skin

鎖の数(STRANDEDNESS) : 二本鎖 (double)

細胞の種類(CELL TYPE) : fibroblast

トポロジー(TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

直接起源 (IMMEDIATE SOURCE) :

配列の種類(MOLECULE TYPE) : cDNA to mRNA

ライプラリーナム(LIBRARY) : Human foreskin cDNA library

ハイポセティカル配列(HIPOTHTICAL) : No

ry

アンチセンス(ANTI-SENCE) : No

クローン名(CLONE) : pGAF1

起源(ORIGINAL SOURCE)

配列:

TGAAACAGCA GATTACTTTT ATTTATGCAT TTAATGGATT GAAGAAAAGA ACCTTTTTT 60
 TTCTCTCTCT CTCTGCAACT GCAGTAAGGG AGGGGAGTTG GATATACTC GCCTAATATC 120
 TCCTGGGTTG ACACCATCAT TATTGTTAT TCTTGTGCTC CAAAGCCGA GTCTCTGAT 180
 GGCTCCCTTA GGTGAAGTTG GGAACTATT CGGTGTGCGAG GATGCGGTAC CGTTGGGAA 240
 TGTGCCCGTG TTGCCGGTGG ACAGCCCCGT TTTGTTAACGTT GACCACCTGG GTCACTCCGA 300
 AGCAGGGGGG CTCCCCAGGG GACCCGCAGT CACGGACTTG GATCATTAA AGGGGATTCT 360
 CAGGCCGAGG CAGCTATACT GCAGGACTGG ATTCACTTA GAAATCTTCC CCAATGGTAC 420
 TATCCAGGGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTTGGCATT CTGGAATTAA TCAGTATAGC 480
 AGTGGGCCTG GTCAGCATTG GAGGGCTGGA CAGTGGACTC TACCTCGGGA TGAATGAGAA 540
 GGGGGAGCTG TATGGATCAG AAAAACTAAC CCAAGACTGT GTATTCAGAG AACAGTTCGA 600
 AGAAAACCTGG TATAATACGT ACTCGTCAA CCTATATAAG CACGTGGACA CTGGAAGGCG 660
 ATACTATGTT GCATTAATAA AAGATGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CTAAACGGCA 720
 CCAGAAATTC ACACATTAA TACCTAGACC AGTGGACCCC GACAAAGTAC CTGAACTGTA 780
 TAAGGATATT CTAAGCCAAA GTTGACAAAG ACAATTCTT CACTTGAGCC CTTAAAAAAG 840

TAACCACAT AAAGGTTCA CGCGGTGGGT TCTTATTGAT TCGCTGTGTC ATCACATCAG 900
 CTCCACTGTT GCCAACTTT GTCGCATGCA TAATGTATGA TGAGGCTTG GATGGGAATA 960
 TGCTGATTTT GTCTGCACT TAAAGGCTTC TCCTCTGGA GGGCTGCCA GGGCCACTTG 1020
 CTTGATTAT CATGAGAGAA GAGGAGAGAG AGAGAGACTG AGCGCTAGGA GTGTGTGTAT 1080
 GTGTGTGT GTGTGTGT GTGTGTGT ATGTGTGTAG CGGGAGATGT GGGCGGAGCG 1140
 AGAGCAAAAG GACTGCCGCC TGATGCATGC TGAAAAAAAGA CACGCTTTTC ATTTCTGATC 1200
 AGTTGTACTT CATCCTATAT CAGCACAGCT GCCATACTTC GACTTATCAG GATTCTGGCT 1260
 GGTGGCCTGC GCGAGGGTGC AGTCTTACTT AAAAGACTTT CAGTTAATTC TCACTGGTAT 1320
 CATCGCAGTG AACTTAAAGC AAAGACCTCT TAGAAAAAAA TAAAAAAAATAA 1380
 AAATAAAAAA AGTTAAATT ATTATAGAA ATTCCAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA 1440
 AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAA 1493.

【0072】配列番号(SEQ ID NO) : 3

配列の長さ(SEQUENCE LENGTH) : 21

配列の型(SEQUENCE TYPE) : アミノ酸 (amino acid)

鎖の数(STRANDEDNESS) : 一本鎖 (single)

トポロジー(TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類(MOLECULE TYPE) : タンパク質 (protein)

ハイポセティカル配列(HIPOTHTICAL) : No

アンチセンス(ANTI-SENCE) : No

フラグメント型(FRAGMENT TYPE) : N-terminal fragment

起源(ORIGINAL SOURCE)

生物名(ORGANISM) : Homo sapiens

ハプロタイプ(HAPLO TYPE) : 2n

組織の種類(TISSUE TYPE) : brain

細胞の種類(CELL TYPE) : glioma

セルライン(CELL LINE) : NMC-G1

配列の特徴(FEATURE)

特徴を決定した方法(IDENTIFICATION METHOD) : E

3 Xaa= His または Pro

14 Xaa= undetermined

配列:

Ala Asp Xaa Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly Gly Leu Pro Xaa Gly Pro

5

10

15

Ala Val Thr Asp Leu

20.

【0073】配列番号(SEQ ID NO) : 4

配列の長さ(SEQUENCE LENGTH) : 13

配列の型(SEQUENCE TYPE) : アミノ酸 (amino acid)

鎖の数(STRANDEDNESS) : 一本鎖 (single)

トポロジー(TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類(MOLECULE TYPE) : タンパク質 (protein)

ハイポセティカル配列(HIPOTHTICAL) : No

アンチセンス(ANTI-SENCE) : No

フラグメント型(FRAGMENT TYPE) : N-terminal fragment

起源(ORIGINAL SOURCE)

生物名(ORGANISM) : Homo sapiens

ハプロタイプ(HAPLO TYPE) : 2n

組織の種類(TISSUE TYPE) : brain

細胞の種類(CELL TYPE) : glioma

セルライン(CELL LINE) : NMC-G1

配列の特徴(FEATURE)

1 Xaa = undetermined

12 (Ser) = predicted

特徴を決定した方法(IDENTIFICATION METHOD) : E

配列:

Xaa Gln Asp Ala Val Pro Phe Gly Asn Val Pro (Ser) Leu

5

10.

【0074】配列番号(SEQ ID NO) : 5

配列の長さ(SEQUENCE LENGTH) : 23

配列の型(SEQUENCE TYPE) : アミノ酸 (amino acid)

鎖の数(STRANDEDNESS) : 一本鎖 (single)

トポロジー(TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類(MOLECULE TYPE) : タンパク質 (protein)

ハイポセティカル配列(HIPOTHTICAL) : No

フラグメント型(FRAGMENT TYPE) : N-terminal fragment

起源(ORIGINAL SOURCE)

生物名(ORGANISM) : Homo sapiens

ハプロタイプ(HAPLO TYPE) : 2n

組織の種類(TISSUE TYPE) : brain

細胞の種類(CELL TYPE) : glioma

セルライン(CELL LINE) : NMC-G1

配列の特徴(FEATURE)

1 Xaa = Leu または Ala

20 (Pro) = predicted

21 Xaa = undetermined

特徴を決定した方法(IDENTIFICATION METHOD) : E

配列:

Xaa Gly Glu Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala Val Pro Phe

5

10

15

Gly Asn Val (Pro) Xaa Leu Leu
20.

【0075】配列番号(SEQ ID NO) : 6

配列の長さ(SEQUENCE LENGTH) : 25

配列の型(SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数(STRANDEDNESS) : 一本鎖 (single)

トポロジー(TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類(MOLECULE TYPE) : 他の核酸 (other nucleic acid)

c acid) 合成DNA(synthetic DNA)

ハイポセティカル配列(HIPOHTICAL) : Yes

アンチセンス(ANTI-SENCE) : No

配列の特徴(FEATURE)

11, 14 I = inosine

配列:

AAGGATCCGT IGGIAAYTAY TTYGG 25.

【0076】配列番号(SEQ ID NO) : 7

配列の長さ(SEQUENCE LENGTH) : 25

配列の型(SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数(STRANDEDNESS) : 一本鎖 (single)

トポロジー(TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類(MOLECULE TYPE) : 他の核酸 (other nucleic acid)

配列:

GGATCCGTGG GGAACATTCTT CGGGGTGCAG GATGCGGTCC CCTTCGGCAA CGTGAATTG 59.

【0078】配列番号(SEQ ID NO) : 9

配列の長さ(SEQUENCE LENGTH) : 30

配列の型(SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数(STRANDEDNESS) : 一本鎖 (single)

トポロジー(TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類(MOLECULE TYPE) : 他の核酸 (other nucleic acid)

c acid) 合成DNA(synthetic DNA)

ハイポセティカル配列(HIPOHTICAL) : Yes

アンチセンス(ANTI-SENCE) : No

配列:

TGGGAACTA TTTCGGGTG CAGGATCCGG 30.

【0079】配列番号(SEQ ID NO) : 10

配列の長さ(SEQUENCE LENGTH) : 30

配列の型(SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数(STRANDEDNESS) : 一本鎖 (single)

トポロジー(TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列:

TATGTTAGGT GAAGTTGGGA ACTATTCGG TGTGCGAGGAT GCGGTAC 47.

【0081】配列番号(SEQ ID NO) : 12

配列の長さ(SEQUENCE LENGTH) : 41

配列の型(SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数(STRANDEDNESS) : 一本鎖 (single)

トポロジー(TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列:

CGCATCCTGC ACACCGAAAT AGTTCCCAAC TTCACTAAC A

41.

c acid) 合成DNA(synthetic DNA)

ハイポセティカル配列(HIPOHTICAL) : Yes

アンチセンス(ANTI-SENCE) : Yes

配列の特徴(FEATURE)

14, 20, 23 I = inosine

配列:

AAGAATTCAC RTTICRAAI GGIAC 25.

【0077】配列番号(SEQ ID NO) : 8

配列の長さ(SEQUENCE LENGTH) : 59

配列の型(SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数(STRANDEDNESS) : 二本鎖 (double)

トポロジー(TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類(MOLECULE TYPE) : 他の核酸 (other nucleic acid)

(PCR product from genomic DNA)

ハイポセティカル配列(HIPOHTICAL) : No

アンチセンス(ANTI-SENCE) : No

起源(ORIGINAL SOURCE)

生物名(ORGANISM) : Homo sapiens

配列:

GGATCCGTGG GGAACATTCTT CGGGGTGCAG GATGCGGTCC CCTTCGGCAA CGTGAATTG 59.

配列の種類(MOLECULE TYPE) : 他の核酸 (other nucleic acid)

c acid) 合成DNA(synthetic DNA)

ハイポセティカル配列(HIPOHTICAL) : Yes

アンチセンス(ANTI-SENCE) : Yes

配列:

ACGTTGCCGA AGGGGACCGC ATCCTGCACC 30.

【0080】配列番号(SEQ ID NO) : 11

配列の長さ(SEQUENCE LENGTH) : 47

配列の型(SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数(STRANDEDNESS) : 一本鎖 (single)

トポロジー(TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類(MOLECULE TYPE) : 他の核酸 (other nucleic acid)

c acid) 合成DNA(synthetic DNA)

ハイポセティカル配列(HIPOHTICAL) : No

アンチセンス(ANTI-SENCE) : No

配列:

TATGTTAGGT GAAGTTGGGA ACTATTCGG TGTGCGAGGAT GCGGTAC 47.

配列の種類(MOLECULE TYPE) : 他の核酸 (other nucleic acid)

c acid) 合成DNA(synthetic DNA)

ハイポセティカル配列(HIPOHTICAL) : No

アンチセンス(ANTI-SENCE) : Yes

【図面の簡単な説明】

【図1】ヘパリンセファロース（登録商標）CL-6Bカラムクロマトグラフィー（実施例1②ステップ1）でのたん白と活性の溶出パターンを示す図である。

【図2】セファクリルS-200HRカラムクロマトグラフィー（実施例1②ステップ3）でのたん白と活性の溶出パターンを示す図である。

【図3】ヘパリンセファロース（登録商標）CL-6Bカラムクロマトグラフィー（実施例1②ステップ4）でのたん白と活性の溶出パターンを示す図である。

【図4】HR-894ヘパリンアフィニティー高速液体カラムクロマトグロフィー（実施例1②ステップ5）でのたん白と活性の溶出パターンを示す図である。

【図5】Vydac C4高速液体カラムクロマトグロフィー（実施例1②ステップ6）でのたん白と活性の溶出パターンを示す図である。

【図6】精製グリア活性化因子（NMC-G1由来）のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動図である。

【図7】精製グリア活性化因子のグリア細胞に対する増殖促進活性を示すグラフである。

【図8】NMC-G1由来精製グリア活性化因子のグリア細胞に対する増殖促進活性を示すグラフである。

【図9】グリア活性化因子（NMC-G1由来）によるグリア細胞数の増加を示す図である。

【図10】グリア活性化因子（NMC-G1由来）によるグリア細胞へのトリチウムチミジン取り込み促進の経時変化を示す図である。●はGAF添加群を○はGAF無添加のコントロール群を示す。

【図11】精製グリア活性化因子（NMC-G1由来）の線維芽細胞マウスBALB/3T3cloneA31細胞に対する増殖促進活性を示すグラフである。

【図12】NMC-G1由来精製グリア活性化因子の線維芽細胞マウスBALB/3T3cloneA31細胞に対する増殖促進活性を示すグラフである。

【図13】精製グリア活性化因子（NMC-G1由来）のヒトさい帯血管内皮細胞に対する増殖促進活性を示す図である。

【図14】精製グリア活性化因子（NMC-G1由来）のラット副腎褐色細胞腫由来PC-12細胞株に対するトリチウム取り込み促進活性を示す図である。

【図15】グリア活性化因子（NMC-G1由来）活性の熱・酸安定性を示すグラフである。

【図16】aFGF、bFGFとグリア活性化因子（N

MC-G1由来）間の免疫学的交差性を示す図である。

【図17】GAF（NMC-G1由来）のビオチニル化コンカナバリンAおよびアビディンとビオチニル化ペルオキシダーゼを用いた染色の図である。

【図18】GAF（NMC-G1由来）のN-グリカナーゼ処理の結果である。

【図19】GAF cDNAの塩基配列とそれにより規定されるアミノ酸配列を示す図である。

【図20】pGAF1をCOS-7細胞で発現させ、グリア細胞に対する増殖促進活性を測定した結果である。

【図21】プラスミドpDGAF1の構築を示す図である。

【図22】メトレキセート耐性CHO細胞培養上清中に含まれるGAF活性を示す図である。

【図23】プラスミドpETGAF1の構築を示す図である。

【図24】MM294（DE3）/pLysS, pETGAF1の抽出物中に含まれるrhGAFをウエスタンプロッティング法により染色した図である。

【図25】疎水カラムクロマトグラフィー（実施例7(3)ステップ2）でのたん白の溶出パターンを示す図である。

【図26】ヘパリンアフィニティー高速液体カラムクロマトグラフィー（実施例8-(3)ステップ3）でのたん白の溶出パターンを示す図である。

【図27】精製rhGAFのSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動図である。

【図28】精製rhGAFをウエスタンプロッティング法により染色した図である。

【図29】精製rhGAFのグリア細胞に対する増殖促進活性を示す図である。

【図30】精製rhGAFの線維芽細胞株BALB/3T3cloneA31細胞に対する増殖促進活性を示す図である。

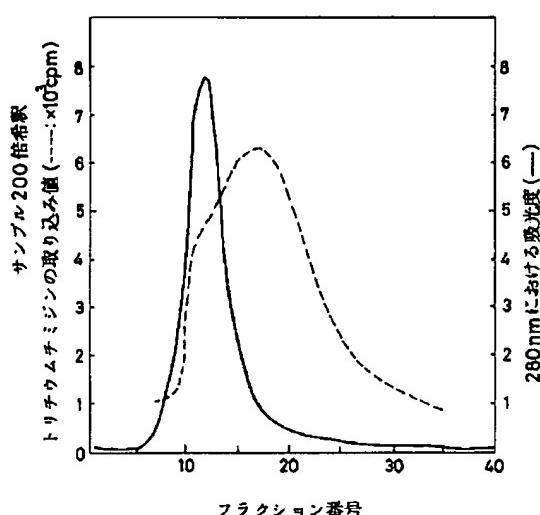
【図31】精製rhGAFのラット血管平滑筋細胞に対する増殖促進活性を示す図である。

【図32】精製rhGAFのヒトさい帯血管内皮細胞増殖に対する作用を示す図である。

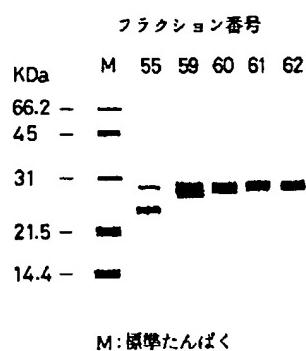
【図33】精製rhGAFのマウス骨髄細胞増殖に対する作用を示す図である。

【図34】精製rhGAFのマウス骨髄細胞中巨核芽球に対する作用を示す図である。

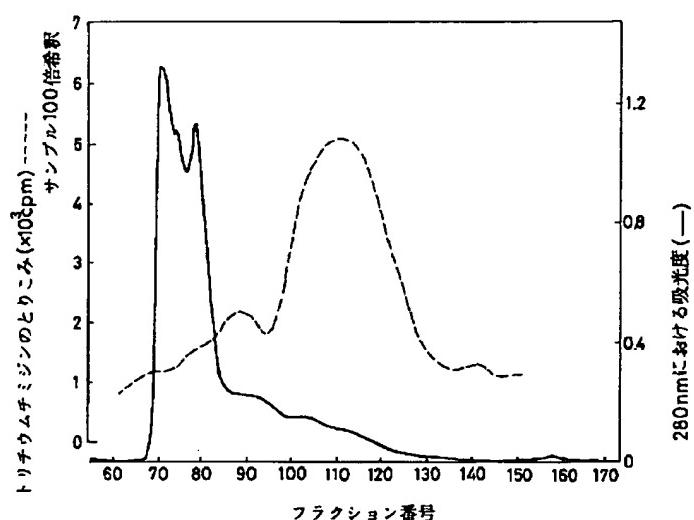
【図1】



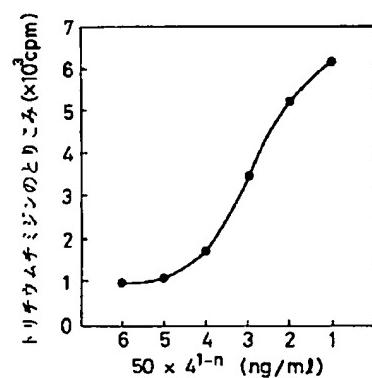
【図6】



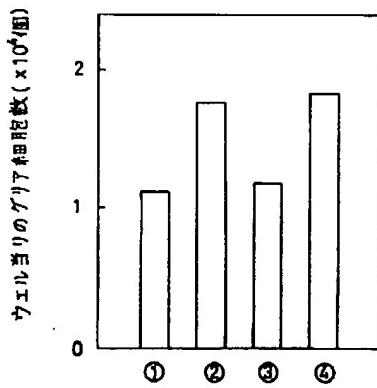
【図7】



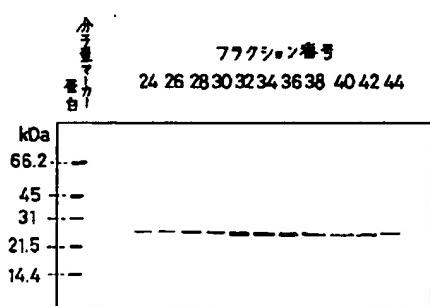
【図27】



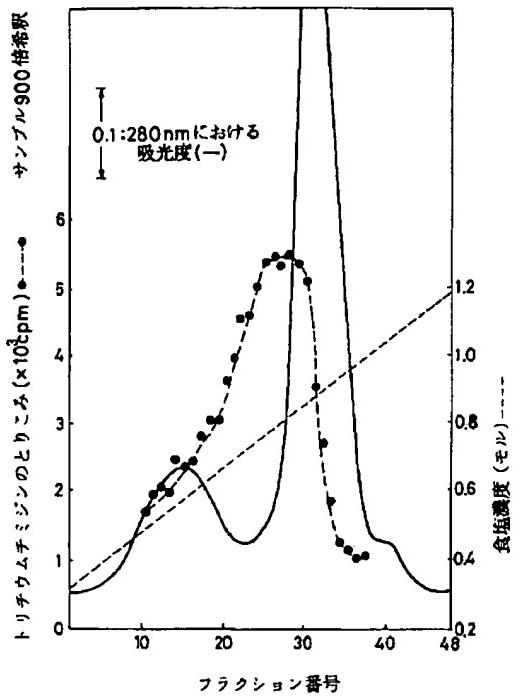
【図9】



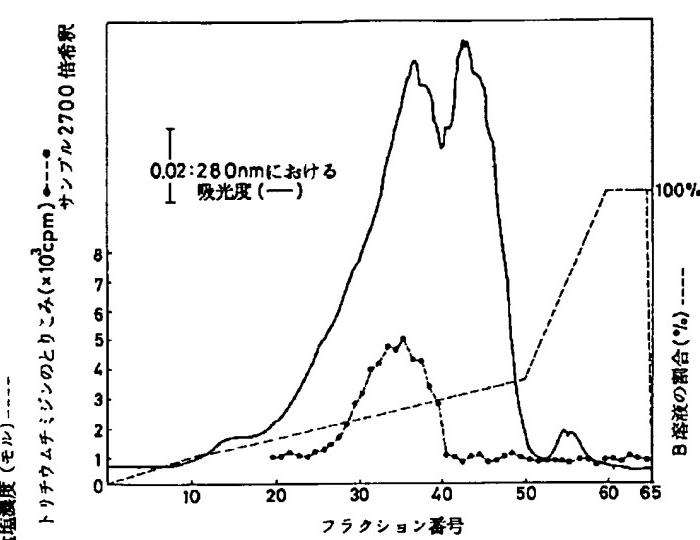
- ① 対照群
- ② GAF添加群
- ③ ハeparin添加群
- ④ GAFおよびハeparin添加群



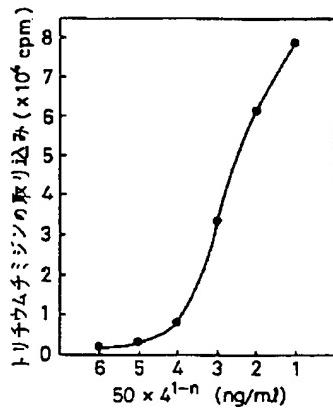
【図3】



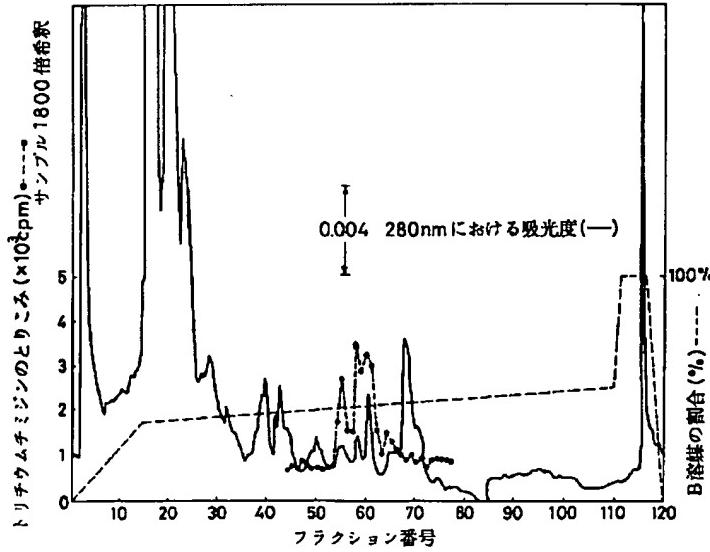
【図4】



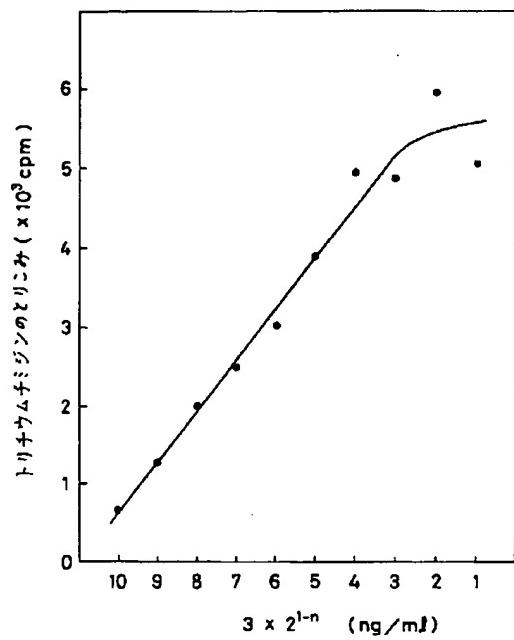
【図11】



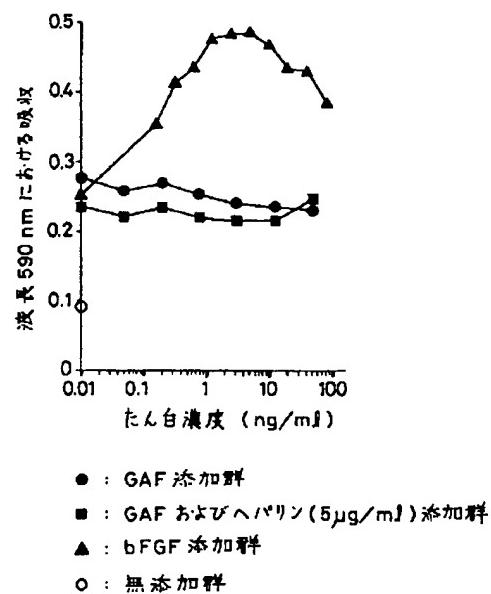
【図5】



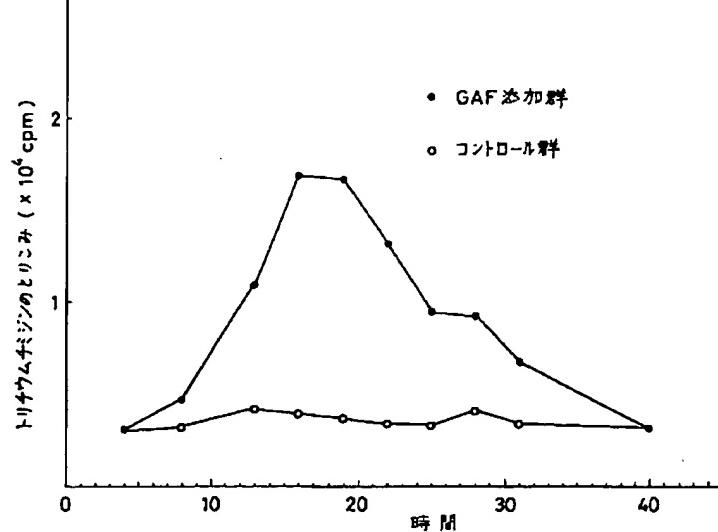
【図8】



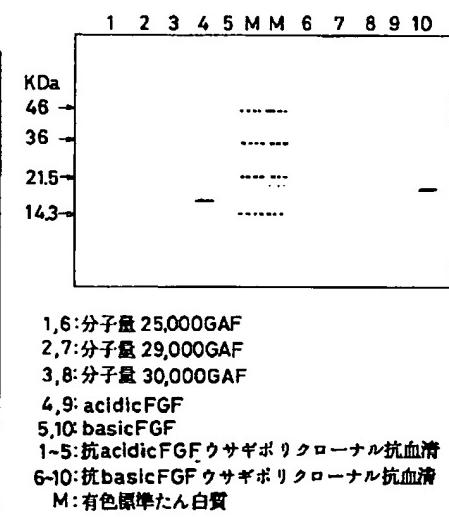
【図13】



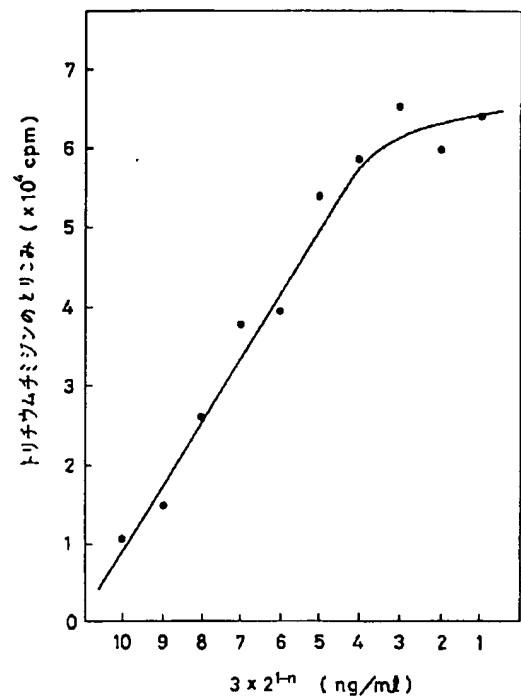
【図10】



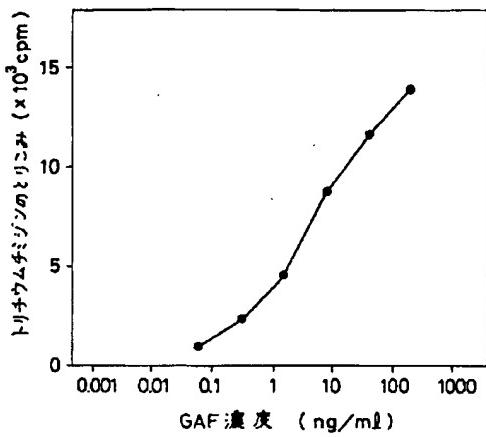
【図16】



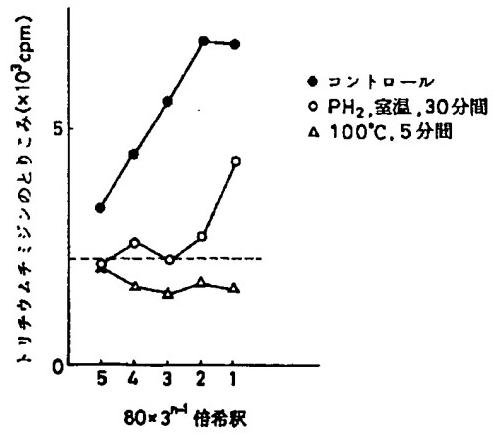
【図12】



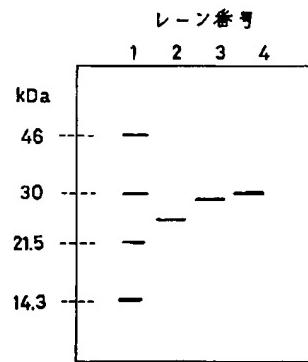
【図14】



【図15】

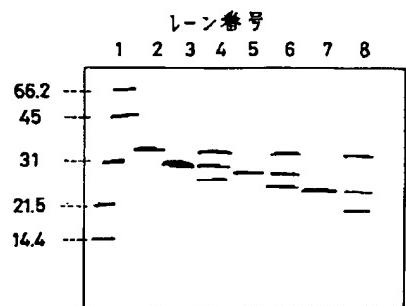


【図17】



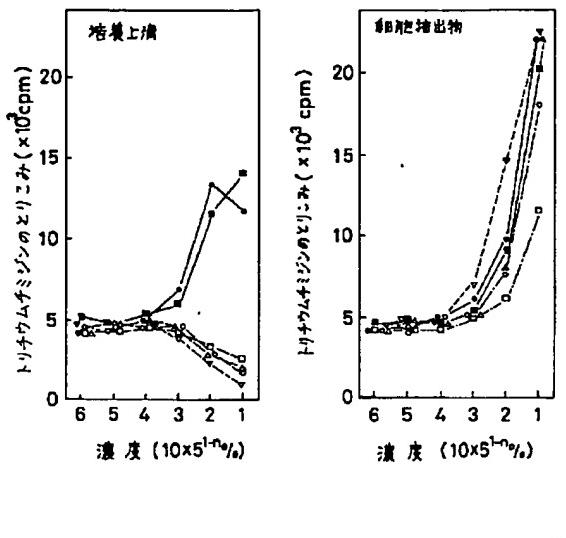
1. 有色標準たんぱく(アマーチャム社製、米国)
2. 25kDa GAF
3. 29kDa GAF
4. 30kDa GAF

【図18】



1. 標準たんぱく
2. N-グリカナーゼのみ
3. 30 kDa GAF
4. 30 kDa GAF + N-グリカナーゼ
5. 29 kDa GAF
6. 29 kDa GAF + N-グリカナーゼ
7. 25 kDa GAF
8. 25 kDa GAF + N-グリカナーゼ

【図20】



【図19-2】

910 920 930 940 950 960
 CTCCACTGTTGCCAAACTTGTCCCATGCATAATGTATGATGGAGGCTGGATGGATAA

 970 980 990 1000 1010 1020
 TGCTGATTTTGTCTGCACTTAAAGGCTTCCTCCTGGAGGGCTGCCTAGGGCCACTTG

 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 CTTGATTATCATGAGACAAGAGGAGAGAGAGAGACTGAGCGCTAGGACTGTGTAT

 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTATGTGTAGCGGGAGATGTGGCGGAGCG

 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 AGAGCAAAAGGACTGCGGCCCTQATGCATGCTCGAAAAAGACACCGCTTTCTGATC

 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 AGTTGACTTCATCCTATATCAGCACAGCTGCCATACTTCGACTTATCAGGATTCTGGCT

 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 GGTGGCCCTGCGCGAGGGTGCAGTCTTACTTAAAGACTTTCAAGTAAATTCTCACTGGTAT

 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 CATCGCACTGAACCTAAAGCAAAGACCTCTTAGTAAAAAATAAAAAAATAAAAAATAA

 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 AAATAAAAAAAAGTTAAATTATTTATAGAAATTCCAAAAAAATAAAAAAATAAAAAATAA

 1450 1460 1470 1480 1490

【図19-1】

```

      10       20       30       40       50       60
TGAAAACAGCAGATTACTTTTATTTATGCATTAATGGATTGAAAGAAAAAACCTTTTTT

      70       80       90      100      110      120
TTCTCTCTCTCTGCAACTGCACTAAGGGAGGGAGTTGGATATAACCTCCCTAATATC

      130      140      150      160      170      180
TCCTGGGTGACACCACATTATGTTATTCTGTGCTCCAAAAGCCGAGTCCTCTGAT
Me

      190      200      210      220      230      240
GGCTCCCTTAGGTGAAGTTGGAACTATTTCCGTGTCAGGATGCGGTACCGTTGGAA
tAlaProLeuGlyGluValGlyAsnTyrPheGlyValGlnAspAlaValProPheGlyAs

      250      260      270      280      290      300
TGTGCCCGTGTGCCGGTGGACAGCCCCTGGTTAAGTGGACCACTGGTCAGTCCGA
nValProValLeuProValAspSerProValLeuLeuSerAspHisLeuGlyGlnSerG

      310      320      330      340      350      360
ACCAGGGGGGCTCCCCAGGGGACCCGCACTCACGGACTGGATCATTTAAAGGGGATTCT
uAlaGlyGlyLeuProArgGlyProAlaValThrAspLeuAspHisLeuLysGlyIleLe

      370      380      390      400      410      420
CAGGCCGAGCAGCTATACTGCAGGACTGGATTCACCTAGAAATCTTCCCAATGCTAC
uArgArgArgGlnLeuTyrCysArgThrGlyPheHisLeuGlutLePheProAsnGlyTh

      430      440      450      460      470      480
TATCCAGGGAAACAGGAAAGACCACAGCCGATTGGCATTCTGGAAATTATCAGTATAGC
rileGinGlyThrArgLysAspHisSerArgPheGlyIleLeuGluPhelleSerileAl

      490      500      510      520      530      540
ACTGGCCCTCGTCAGCATTGAGGCCTGGACAGTGGACTCTACCTCGGGATGAATGAGAA
aValGlyLeuValSerileArgGlyValAspSerGlyLeuTyrLeuGlyMetAsnGluLY

      550      560      570      580      590      600
GGGGGAGCTGTATGGATCAGAAAAAACTAACCCAAAGAGTGTGTATTCAAGAGAAACAGTCGA
sGlyGluLeuTyrGlySerGluLysLeuThrGlnGluCysValPheArgGluGlnPheG

      610      620      630      640      650      660
AGAAAACCTGGTATAATACGTAACCGTCAAACCTATATAAGCACGTGGACACTGGAAAGGCG
uGluAsnTrpTyrAsnThrTyrSerSerAsnLeuTyrLysHisValAspThrGlyArgAr

      670      680      690      700      710      720
ATACTATGTTGCATTAAATAAACTGGACCCCGAGAGAAAGGACTAGGACTAAACGGCA
gTyrTyrValAlaLeuAsnLysAspGlyThrProArgGluGlyThrArgThrLysArgIII

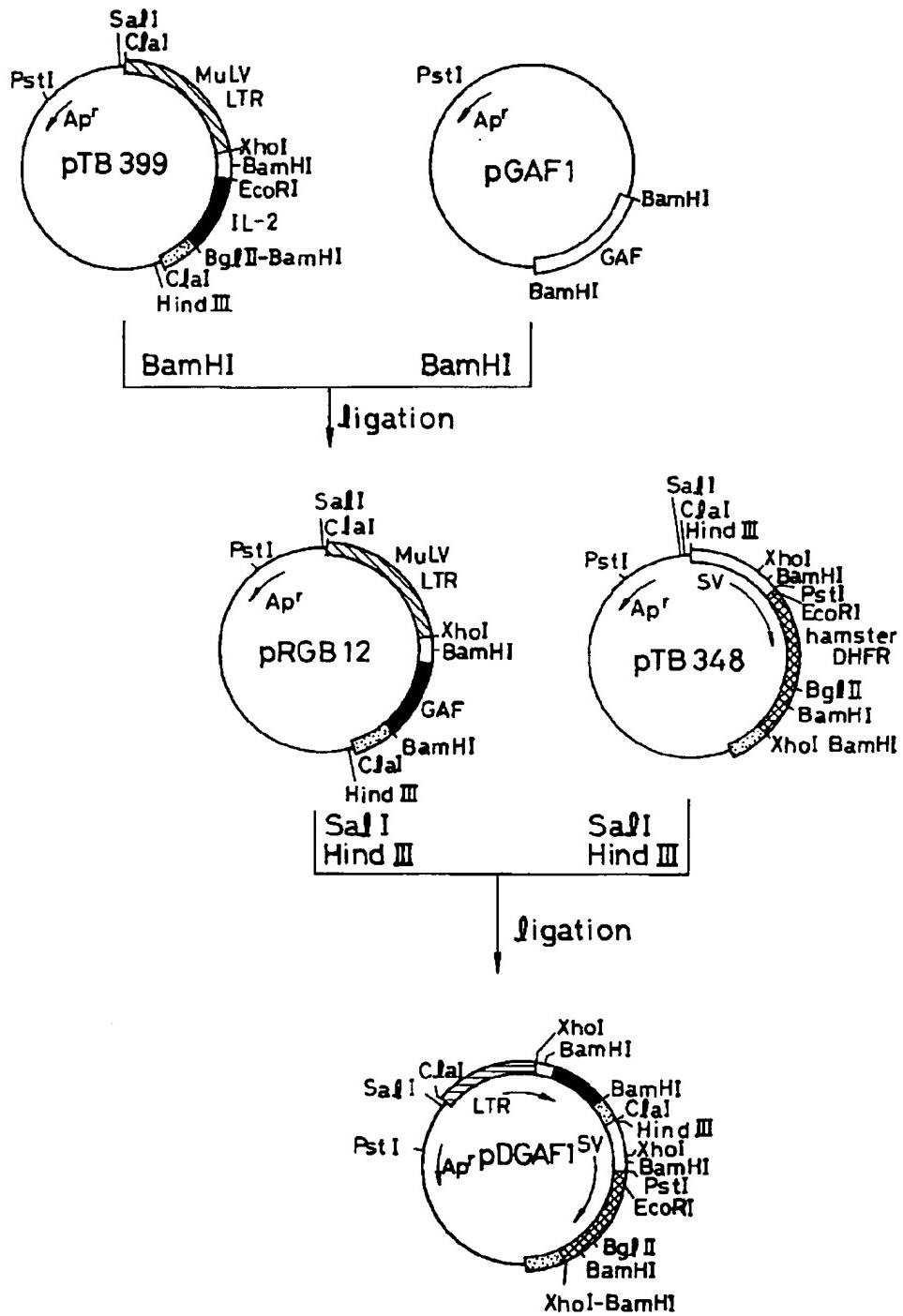
      730      740      750      760      770      780
CCAGAAATTACACATTTTACCTAGACCACTGCACCCCGACAAAGTAGCTGAACTGTA
sGinLysPheThrHisPheLeuProArgProValAspProAspLysValProGluLeuTy

      790      800      810      820      830      840
TAAGGATATTCTAAGCCAAGTTGACAAAGACAATTCTTCACTTGAGCCCTTAAAAAG
rLysAspIleLeuSerGlnSerEnd

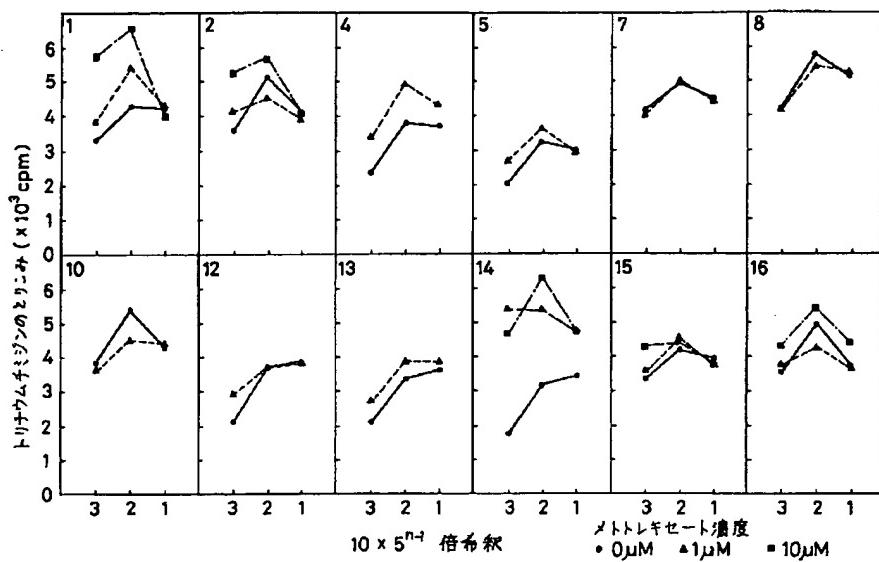
      850      860      870      880      890      900
TAACCACTATAAAGGTTTACGCCGTGGCTTCTTATTGATTCGCTGTGTCATCACATCAG

```

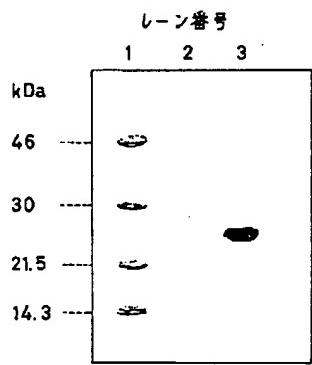
【図21】



【図22】

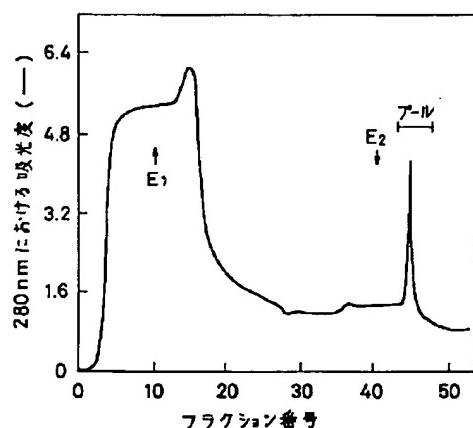


【図24】



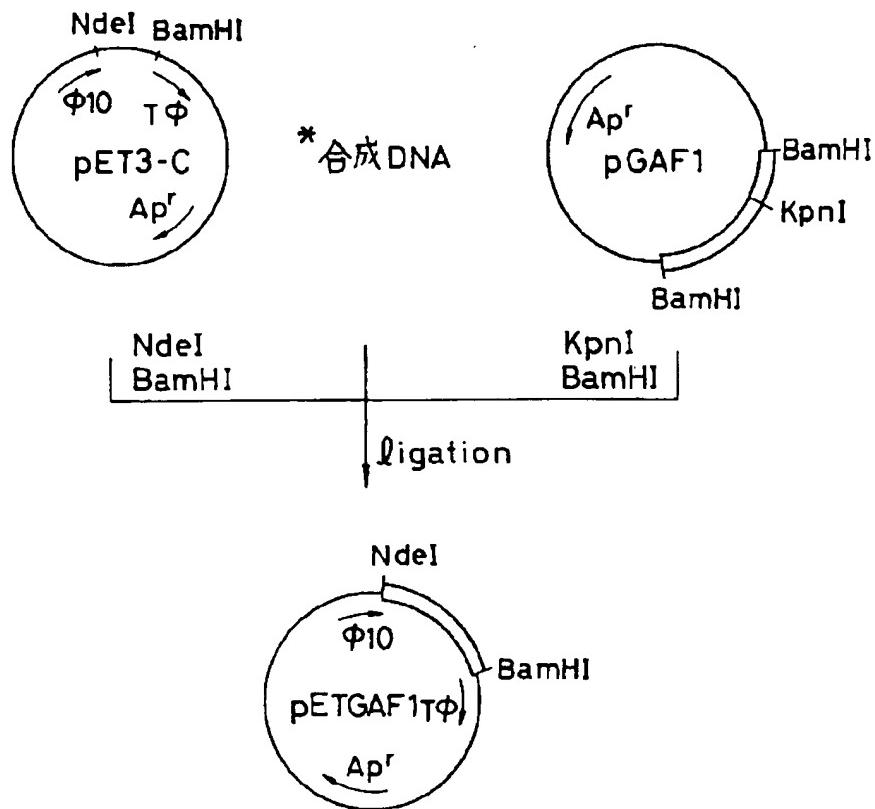
1. 有色標準たんぱく(アーチャム社製、米国)
2. MM294(DE3)/pLys, pET3-C抽出物
3. MM294(DE3)/pLys, pETGAF1の抽出物

【図25】



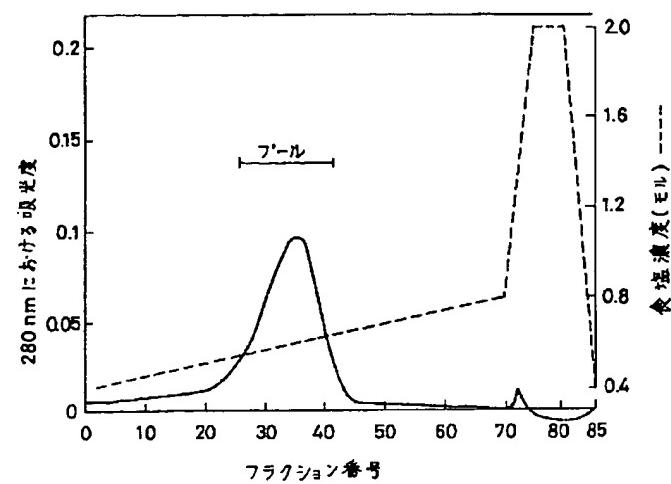
- E₁ : 12.5% 飽和硫酸と 2mM aPMSF を含む
20mM Tris塩酸緩衝液 (pH7.6)
E₂ : 15% グリセリン、0.1% CHAPS および 2mM
aPMSF を含む 20mM Tris塩酸緩衝液 (pH7.6)

【図23】

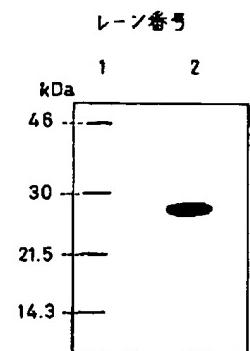


*
5'-TATGTTAGGTGAAGTTGGAACTATTCGGTGTGCAGGATGCGGTAC -3'
ACAATCCACTTCAACCCCTTGATAAAGCCACACGTCCCTACGC

【図26】



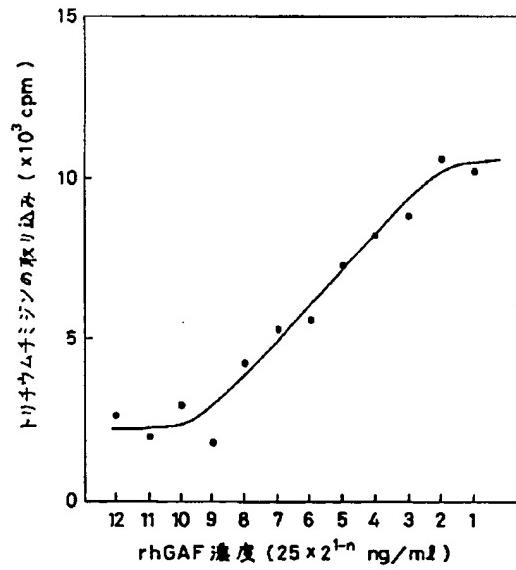
【図28】



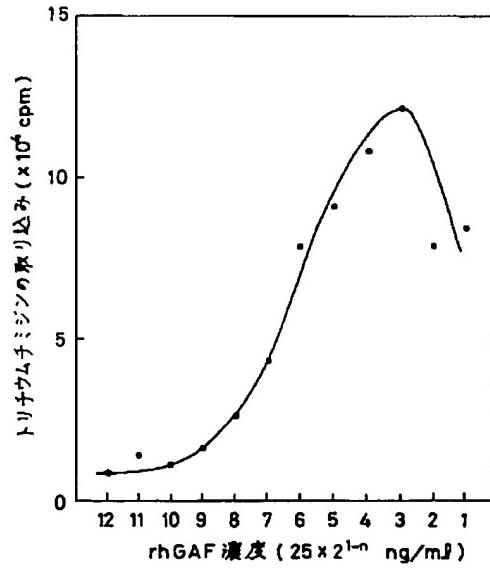
1. 有色標準たん白 (アマ-ジャム社製,米国)

2. 精製 rhGAF

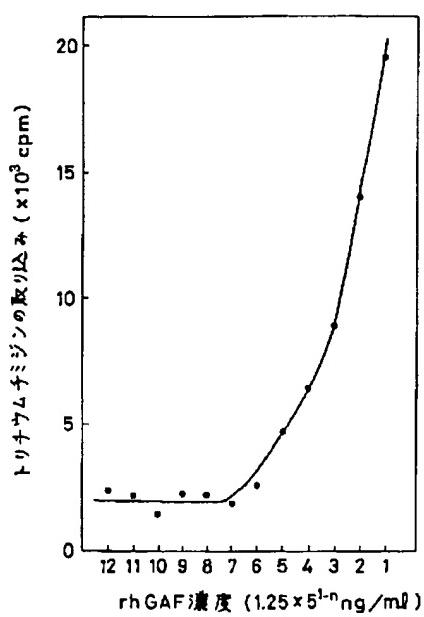
【図29】



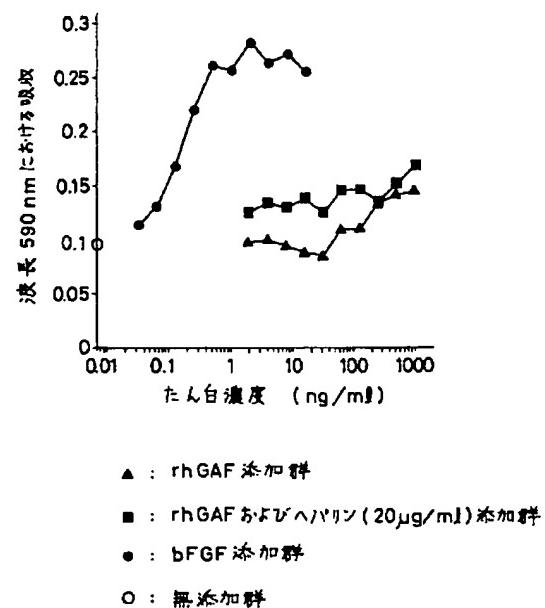
【図30】



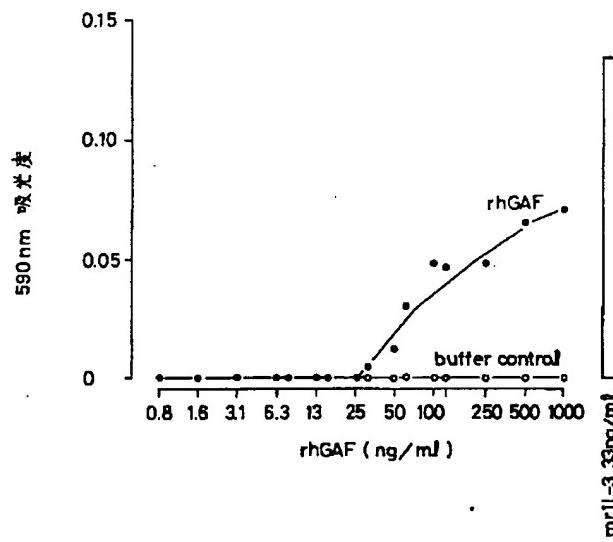
【図31】



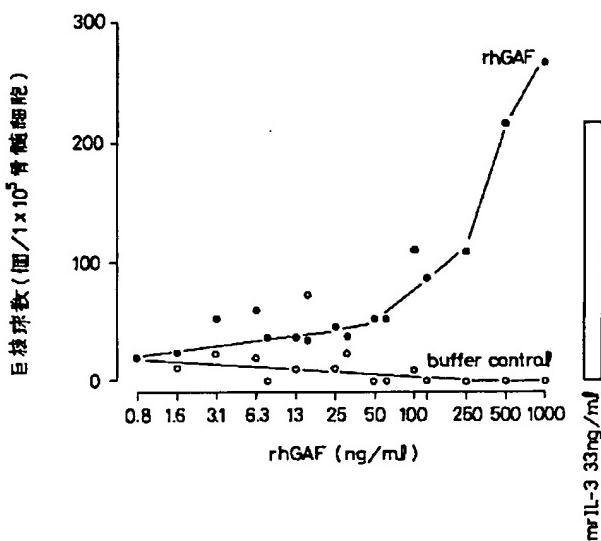
【図32】



【図33】



【図3-4】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁵ 識別記号 庁内整理番号 F I 技術表示箇所
C 1 2 N 15/18 Z N A
C 1 2 P 21/02 H 8214-4 B
// A 6 1 K 37/02 A A B 8314-4 C
A D S
(C 1 2 N 1/21
C 1 2 R 1:19)
(C 1 2 P 21/02
C 1 2 R 1:19)
(C 1 2 P 21/02
C 1 2 R 1:91)

GLIA-ACTIVATING FACTOR AND ITS PRODUCTION

Patent Number: JP5301893

Publication date: 1993-11-16

Inventor(s): NARUO KENICHI; others: 03

Applicant(s): TAKEDA CHEM IND LTD

Requested Patent: JP5301893

Application Number: JP19920003399 19920110

Priority Number(s):

IPC Classification: C07K13/00; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/18; C12P21/02

EC Classification:

EC Classification:

Equivalents:

Abstract

PURPOSE:To find out the new factor having a specific glia cell multiplication- stimulating action and a nutrient-activating action, and further to provide the method of efficiently producing the new factor.

CONSTITUTION:A man-originated glioma cell strain is cultured, and the glia- activating growth factor is isolated from the supernatant of the culture solution and purified, while using the glia cell multiplication activity of rat brain cells as an indicator. The basic sequence of a cDNA coding the glia-activating growth factor and the amino acid sequence estimated from the basic sequence of the cDNA are clarified, and subsequently the GAF is expressed by a genetic engineering method. The obtained glia-activating factor is a new protein, has an activity to multiply the glia cells and fibroblasts, and can be expected as a medicine such as a cerebral disease-improving medicine.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.